

HANS WEBER

**MOLEKULARE MECHANISMEN DER VIRUS-REPLIKATION:
STUDIEN AM BAKTERIOPHAGEN Q β**

Habilitationsschrift zur Erlangung der *venia legendi*
an der Philosophischen Fakultät II der Universität Zürich

aku-Fotodruck

Zürich

1980



Digitized by the Internet Archive
in 2026

HANS WEBER

**MOLEKULARE MECHANISMEN DER VIRUS-REPLIKATION:
STUDIEN AM BAKTERIOPHAGEN Q β**

Habilitationsschrift zur Erlangung der *venia legendi*
an der Philosophischen Fakultät II der Universität Zürich

aku-Fotodruck

Zürich

1980



Verdankungen

An erster Stelle möchte ich Professor Charles Weissmann meinen aufrichtigen Dank aussprechen für die Ermöglichung dieser Arbeit in seinem Institut, für Rat und Ermutigung sowie für die Ueberlassung vieler Materialien. Auch Professor Martin Billeter verdanke ich viele freundschaftliche Diskussionen und Materialien. Dr. François Meyer möchte ich besonders danken für unsere jahrelange fruchtbare Zusammenarbeit am gemeinsamen Projekt. Ferner gilt mein Dank Professor Theo Koller und Dr. Hans Jakob Vollenweider für die elektronenmikroskopischen Arbeiten, sowie Dr. Robert Kamen, der in den Anfängen des Projektes wichtige Beiträge leistete. Schliesslich danke ich Hugo Felix, Frank Sek, Dianne Sloane, Katharina Jung und Sylvia Schmidlin für ihre kompetente technische Mitarbeit.

Für einen grosszügigen Beitrag an die Drucklegungskosten dieser Habilitationsschrift bin ich der Privatdozenten-Stiftung der Universität Zürich zu grossem Dank verpflichtet.

Molekulare Mechanismen der Virus-Replikation:

Studien am Bakteriophagen Q β

Inhalt

	Seite
Zusammenfassung	4
1. EINLEITUNG	6
2. DER PHAGE Q β : PHYSISCHER UND GENETISCHER AUFBAU	8
3. DER VIRALE REPRODUKTIONS-ZYKLUS	10
4. DIE REPLIKATION DES VIRUS-GENOMS	14
4.1. Das Auftreten von komplementärer "Minus-Strang"-RNA in infizierten Zellen	14
4.1.1. Das "Replicative Intermediate"	14
4.1.2. Die Isolierung von Minusstrang-RNA	15
4.2. Die Replikation von Q β RNA in vitro	17
4.2.1. Frühe Arbeiten	17
4.2.2. Wirtsfaktor HF und Matrizenspezifität	18
4.2.3. Initiation und Synchronisation der in vitro RNA-Synthese	20
4.3. Der Terminations-Schritt und die Rolle der 3'-terminalen Nukleosid-Reste	23
4.4. Die Untereinheitenstruktur von Q β -Replikase	28
4.4.1. Anzahl, Grösse und genetischer Ursprung der Untereinheiten	28
4.4.2. Replikase ohne α -Untereinheit	29
4.4.3. Die Funktionen der an der phagenspezifischen RNA- Synthese beteiligten Wirtsproteine in der uninfi- zierten Wirtszelle	30
4.5. Das Problem der Erkennung von Q β RNA durch Replikase	32
4.5.1. Matrizenspezifität und 3'-terminale Sequenzen	32
4.5.2. Matrizenaktivität von fragmentierter Q β RNA	33
4.5.3. Untersuchungen an Bindungskomplexen	35

4.5.3.1. Die Bindungsreaktion	35
4.5.3.2. Ribonuklease-Abbau von Bindungskomplexen	37
4.5.3.2.1. Prinzip der Methode	37
4.5.3.2.2. Einfluss der Reaktionsbedingungen	39
4.5.3.2.3. Sequenz, Lokalisierung und Funktion der S-Bindungsstelle	46
4.5.3.2.4. Lokalisierung und Sequenz von Fragmenten der M-Serie	49
4.5.3.2.5. Bindung der isolierten Fragmente M-2 und S-3 an Replikase	55
4.5.3.2.6. Zur Bindung des 3'-Endes von Q β RNA	65
4.5.3.2.7. Abbauprüfungen an Komplexen mit Teilkomponenten des Replikase-Systems	72
4.5.3.2.8. Bindung von Oligonukleotiden aus vollständig mit T $_1$ -RNase abgebauter Q β RNA durch Q β Replikase und ihre Komponenten	75
4.5.3.2.9. Bindungskomplexe mit anderen RNAs	77
4.5.3.3. Elektronenmikroskopische Untersuchung von Bindungskomplexen	79
4.5.4. Modellvorstellungen	84
5. DIE PHAGENSPEZIFISCHE PROTEINSYNTHESE UND IHRE REGULATION	90
5.1. Initiations- und Terminationsstellen der Cistrons	90
5.1.1. Isolierung der ribosomalen Bindungsstellen und Bestimmung ihrer Sequenzen	90
5.1.2. Lokalisierung der Initiations- und Terminations-Stellen der Cistrons: Die Gen-Karte des Phagen Q β	93
5.2. Die zeitliche und quantitative Steuerung der Proteinsynthese	99
5.2.1. Der Verlauf der Proteinsynthese in vivo	99
5.2.2. Die molekularen Regulationsmechanismen bei der phagenspezifischen Proteinsynthese	103
5.2.2.1. Die Affinität der Ribosomen für bestimmte RNA-Sequenzen	103
5.2.2.2. RNA-RNA-Wechselwirkungen als Steuer-Elemente der Protein-Synthese	104
5.2.2.3. Phagenproteine als Translations-Repressoren	106
5.2.2.4. Ein Terminationssignal als Regulator der Proteinsynthese	110
5.2.3. Zusammenfassende Darstellung der regulierten Synthese-Abläufe	110
6. SCHLUSSBETRACHTUNGEN	112
Referenzen	115

Zusammenfassung

Es wird versucht, in einer zusammenhängenden Darstellung einen Überblick über die Molekularbiologie des Bakteriophagen Q β zu vermitteln, wobei das Schwergewicht bewusst auf die Mechanismen der Synthese der phagenspezifischen Makromoleküle gelegt wird. Die drei ersten Kapitel enthalten eine kurze Einführung in den Aufbau und den Reproduktionszyklus des Phagen.

Anschliessend wird die Replikation der Phagen-RNA in ihren in vivo- und in vitro-Aspekten eingehend diskutiert. Diese erfolgt in zwei Schritten: Zuerst wird ein zur Phagen-RNA komplementärer RNA-Strang (Minus-Strang) synthetisiert; dieser dient seinerseits als Matrize für die Herstellung neuer Phagen-RNA. Beide Schritte werden durch ein Enzymsystem katalysiert (Q β -Replikase), welches aus einer Phagen-co-dierten Untereinheit sowie mehreren Wirtsprotein-Komponenten besteht und sich durch eine hohe Selektivität für Phagen-RNA auszeichnet. Folgende Beiträge des Autors zu diesem Thema werden dargelegt:

1. Untersuchungen an in vivo und in vitro hergestellten Phagen-RNA und Minus-Strang-RNA zeigten, dass das 3'-Ende immer durch eine Adenylsäure-Gruppe gebildet wird, welche nicht durch die Matrizensequenz determiniert ist und für die biologische Aktivität der RNA keine Rolle spielt. Verschiedene Kontrollversuche legten die Vermutung nahe, dass das Anhängen dieser Gruppe durch Replikase einen Kettenterminations- oder Freisetzungsschritt darstellt.
2. Umfangreiche Arbeiten sind der Frage nach der molekularen Grundlage für die hohe Matrizen-Selektivität von Replikase gewidmet. Die prinzipielle Versuchsanordnung bestand darin, dass Komplexe von Replikase und Q β RNA einem milden Abbau durch Ribonukleasen unterzogen wurden. Die direkt am Enzym haftenden RNA-Fragmente wurden dann isoliert, kartiert und sequenziert. Auf diese Weise gelang es, zwei Regionen innerhalb der Q β RNA als Enzym-Bindungsstellen zu charakterisieren, die eine bei ca. 1/3 der RNA-Länge vom 5'-Ende, am

Anfang des Hüllprotein-Cistrons (S-Stelle), die andere bei ca. 2/3 der RNA-Länge, im Replikase-Cistron (M-Stelle). RNA-Fragmente aus diesen zwei Regionen haben eine besonders hohe Affinität für Replikase und wirken hemmend auf die Initiation der RNA-Synthese mit Q β RNA als Matrize. Die Bindung von Replikase am 3'-Ende der Matrizen-RNA, wo die RNA-Synthese ihren Anfang nimmt, ist offensichtlich schwach und kann in dieser Versuchsanordnung nur nachgewiesen werden, wenn die Initiation schon erfolgt ist. Diese und weitere Ergebnisse führen zu einem Modell der Enzym-Matrizen-Erkennung, bei welchem die Spezifität sowohl auf der Sequenz-Erkennung an der M- und S-Stelle, als auch auf der räumlichen Anordnung von S-Stelle, M-Stelle und 3'-Ende beruht.

In einem zweiten Hauptteil wird die phagenspezifische Proteinsynthese behandelt, wobei den Mechanismen, die für die zeitliche und quantitative Steuerung der Synthesevorgänge verantwortlich sind, besonderes Interesse zufällt. Die Beiträge des Autors zu dieser Frage betreffen den Wirkungsmechanismus gewisser Phagenproteine, welche bei der Regulation der Proteinsynthese eine Rolle spielen (Translations-Repressoren). Es konnte gezeigt werden, dass Q β -Hüllprotein den Anfang des Replikase-Cistrons spezifisch bindet und wahrscheinlich dadurch die bekannte Hemmung der Translation an diesem Cistron hervorruft. In gleicher Weise hemmt Replikase die Bindung von Ribosomen am Anfang des Hüllprotein-Cistrons durch Bindung an die S-Stelle. Die biologische Rolle dieser Regulationsmechanismen wird diskutiert. Schliesslich wird der Versuch unternommen, die vielfältigen bisher bekannten Steuerungs- und Synthesevorgänge in ein kohärentes Gesamtbild der Phagenreplikation zu integrieren.

1. EINLEITUNG

Als vor wenig mehr als 30 Jahren Naturforscher verschiedener Richtungen sich dem Studium der Replikation von Bakteriophagen zuzuwenden begannen, bewegte etliche von ihnen, so Max Delbrück (Stent, 1966), die Hoffnung oder der Verdacht, dass die bis anhin bekannten physikalisch-chemischen Gesetze der unbelebten Natur nicht ausreichen würden, um Lebensvorgänge adäquat zu beschreiben. Phagen und andere Viren waren ohne Zweifel als Untersuchungsobjekte zur Klärung dieser Frage besonders geeignet; denn einerseits erfüllen sie ein wichtiges Kriterium lebendiger Materie, nämlich die Vermehrungsfähigkeit; andererseits hatte die Kristallisation des Tabak-Mosaik-Virus durch Stanley (1935) einige Jahre zuvor gezeigt, dass Viren Eigenschaften aufweisen können, welche man früher als mit der biologischen Welt unvereinbar betrachtet hatte.

Unterdessen hat sich der Vorstoß einiger Sonderlinge zu einem ungeheuer umfangreichen Wissensgebiet, der Molekularbiologie, ausgeweitet. Die grundlegenden Mechanismen eines erheblichen Teils aller Lebensvorgänge, insbesondere der Vererbung, sind heute bekannt. Die bisherigen Befunde lassen sich alle zwanglos in das physikalisch-chemische Weltbild einordnen. Die "romantische Phase" der Molekularbiologie ist überwunden.

Weder die Phagen noch die Viren höherer Organismen haben seither irgend etwas von ihrer hervorragenden Bedeutung als biologische Studienobjekte eingebüßt. Sie liefern nach wie vor unentbehrliche Modellsysteme, nicht nur für die Struktur und Funktion des genetischen Materials, sondern auch für die zeitliche und quantitative Regulation der makromolekularen Synthese, für die makromolekularen Wechselwirkungen, welche der Bildung von höheren Strukturen zugrunde liegen, sowie für unzählige weitere Aspekte zellulären Lebens. Viren und ihre Komponenten sind zudem häufig wertvolle technische Hilfsmittel bei der Untersuchung zellulärer Vorgänge. Methodik und Fragestellung der Molekularbiologie hat sich in zunehmendem Mass auch auf die medizinische Virologie fruchtbringend ausgewirkt. Es ist zu hoffen, dass

die umfangreiche Forschung an Tumorstoffen das Krebsproblem eines Tages einer Lösung näher bringen wird.

Im Jahr 1961 wurde von Zinder und Mitarbeitern (Loeb & Zinder, 1961) eine neuartige Gruppe von Bakteriophagen entdeckt, die an Einfachheit und Kleinheit alle bisher bekannten Viren und Phagen übertraf: Die RNA-Phagen. Wie bei der Mehrheit der Viren höherer Organismen besteht das genetische Material dieser Phagengruppe nicht aus DNA, sondern aus einer einsträngigen RNA, welche Genom und Messenger-RNA in einem ist. Da die RNA dieser Phagen nur wenige tausend Nukleotide umfasst, schien die Hoffnung nicht allzu vermessen, dass es innert absehbarer Zeit möglich sein würde, Struktur und Funktionen dieser primitivsten aller "Lebewesen" in mechanistischem Sinne vollständig zu verstehen. Bereits 1965 gelang es Spiegelman (Spiegelman & al., 1965), die Replikation einer Phagen-RNA *in vitro* auszuführen, wobei das im Reagenzglas synthetisierte Produkt volle Infektivität aufwies. Heute ist die Struktur des Genoms mehrerer RNA-Phagen teilweise bis ins Detail bekannt. Die vollständige Aufklärung der Nukleotidsequenz einer Phagen-RNA (MS2) ist seit 1976 eine Tatsache (Fiers & al., 1976), diejenige einer zweiten (Q β) steht kurz vor dem Abschluss (Levanon & al., 1979; M. Billeter, persönliche Mitteilung). Andererseits hat es sich gezeigt, dass die funktionelle Organisation der RNA-Phagen, und insbesondere ihre Beziehung zur Wirtszelle, einen vorher ungeahnten Grad von Komplexität aufweist (zusammenfassende Darstellungen: Weber & al., 1973; Weissmann & al., 1973; Weissmann, 1974; Zinder, 1975; Blumenthal und Carmichael, 1979). Mit der vorliegenden Arbeit soll versucht werden, einen Begriff von dieser Komplexität zu vermitteln und einige Schritte auf dem Weg zu einem hoffentlich in nicht allzu ferner Zukunft zu erwartenden vollständigen Verständnis der RNA-Phagen darzustellen.

2. DER PHAGE Q β : PHYSISCHER UND GENETISCHER AUFBAU

Die RNA-Phagen lassen sich in eine Anzahl serologischer Untergruppen einteilen. Der zuerst entdeckte Phage, f_2 , gehört zusammen mit den zwei weiteren eingehend bearbeiteten Spezies MS2 und R17 zur Gruppe I. In funktioneller Hinsicht am besten untersucht ist aber der Phage Q β , ein Mitglied der serologischen Gruppe III. Er unterscheidet sich nicht unwesentlich von den Phagen der ersten Gruppe, unter anderem vor allem durch die leichtere Zugänglichkeit seines in vitro-Replikationssystems. Aus diesem Grunde beziehen sich die in unserem Laboratorium ausgeführten Arbeiten wie auch die anderen im folgenden diskutierten Resultate vorwiegend auf Q β .

Der Phage Q β erscheint im Elektronenmikroskop als ein rundes Teilchen von ca. 23 nm Durchmesser, dessen an der Peripherie sichtbare Oberflächenstruktur auf eine icosaedrische Anordnung von Struktureinheiten schliessen lässt. (Fig. 2.1). Ein solches Teilchen besteht aus vier verschiedenen molekularen Komponenten, nämlich:

- A. Einem einsträngigen RNA-Molekül mit einem Molekulargewicht von ca. 1.5×10^6 entsprechend einer Kettenlänge von ca. 4220 Nukleotiden (+ ca. 10 N; Zahl bestimmt aus neusten Sequenzresultaten von M. Billeter und Mitarb.).
- B. Einem Hüllprotein-Mantel bestehend aus ca. 180 Untereinheiten vom Molekulargewicht 14000.
- C. Einem Molekül "Maturationsprotein" vom Molekulargewicht 44000 (auch "A2-Protein" genannt). Es hat eine essentielle Funktion bei der Infektion der Bakterienzelle; über den Wirkungsmechanismus ist aber noch sehr wenig bekannt.
- D. Einer weiteren Proteinkomponente vom Molekulargewicht 38000 ("A1-Protein", "Readthrough-Protein"), deren Gegenwart für die Infektivität der Partikel ebenfalls notwendig ist (Hofstetter & al., 1974). Sie liegt im Normalfall in 2-5 Molekülen pro Partikel vor. (Die Phagen der Gruppe I besitzen keine dem A1-Protein vergleichbare Komponente.)

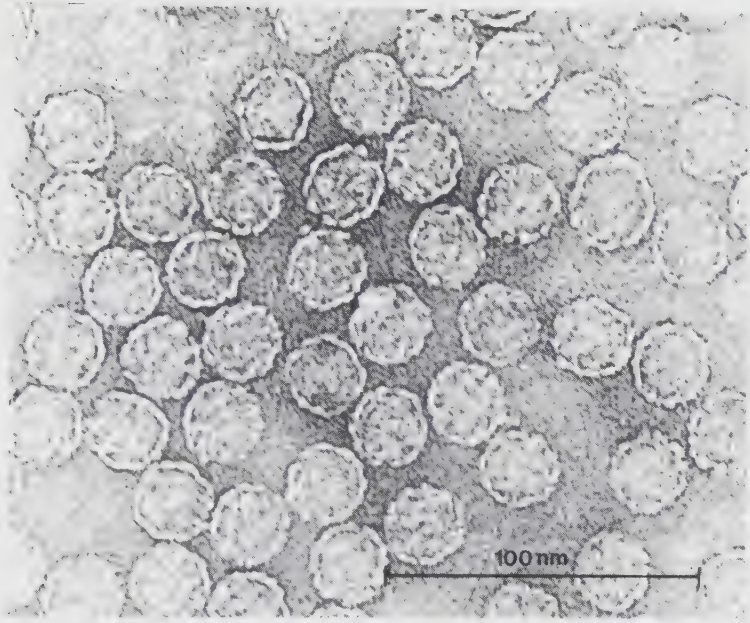


Fig. 2.1. Der Bakteriophage QB im Elektronenmikroskop

Bei mehreren Partikeln sind an der Peripherie deutlich 10 Capsomere (morphologische Einheiten) sichtbar, in Uebereinstimmung mit der Icosaedeltaeder-Anordnung der Hüllprotein-Untereinheiten. (Aufnahme von H. Hofstetter & Th. Koller).

Die Summe der Molekulargewichte dieser Bestandteile ergibt ein Partikel-Molekulargewicht von ca. $4.2 \cdot 10^6$, was gut mit den gemessenen Werten von 4.20 bis $4.29 \cdot 10^6$ übereinstimmt (Overby & al., 1966).

Die Zahl von 180 Hüllprotein-Untereinheiten lässt sich gut mit einem ikosaedrischen Aufbau des Kapsids vereinbaren (Caspar & Klug, 1962). Sie deutet auf eine Ikosadeltaederstruktur mit Triangulationszahl $T = 3$, welche 12 Scheitelpunkte mit fünffacher Rotationssymmetrie sowie 20 Scheitelpunkte mit sechsfacher Rotationssymmetrie aufweist (d.h. 12 Pentamere und 20 Hexamere; ergibt total 180 Struktureinheiten). Die Frage, wo die A1- und A2-Proteine auf oder in der Viruspartikel lokalisiert sind, ist noch ungeklärt. Man sollte annehmen, dass die Gegenwart dieser Proteine die Regelmässigkeit der Viruskapsid-Struktur stören müsste, aber die bisher erhaltenen elektronenmikroskopischen Aufnahmen lassen nichts davon erkennen.

Die RNA des Phagen besitzt, ihrer Kleinheit und der Einfachheit des Phagen entsprechend, eine einfache genetische Struktur (Fig. 2.2). Neben den Cistrons für die drei genannten Phagenproteine enthält das Genom noch ein weiteres Cistron, das für das die Phagen-RNA replizierende Enzym, genannt "Replikase" (genauer gesagt: für eine Untereinheit desselben), codiert, und das fast die Hälfte der Länge der RNA beansprucht. Hüllprotein-Cistron und A1-Cistron sind in einer einzigartigen Anordnung zu einem Doppelcistron vereinigt. Eine eingehendere Diskussion der Genkarte von Q β erfolgt im Kapitel 5.

3. DER VIRALE REPRODUKTIONS-ZYKLUS

Welches sind nun die Vorgänge, die mit dem Zusammentreffen eines Q β Phagen mit einer empfindlichen E.coli-Zelle beginnen, und mit dem Zelltod einerseits und der mehrtausendfachen Vervielfachung der Phagenpartikel ihr Ende nehmen? Die folgende Aufteilung der Geschehnisse ist in einigen Punkten zu schematisch. Sie beschreibt überdies nicht etwa eine rein zeitliche Anordnung der Prozesse, denn mehrere der genannten Vorgänge laufen gleichzeitig nebeneinander her. Trotzdem er-

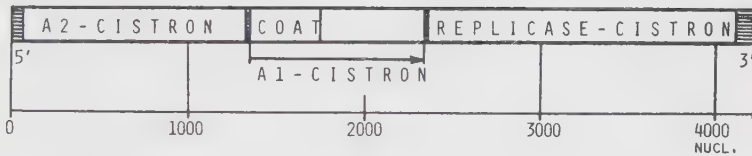


Fig. 2.2. Die Genkarte des Bakteriophagen Qβ

Die Längen der Cistrons und der extracistronischen, bzw. intercistronischen Regionen (schraffiert) sind ungefähr massstäblich dargestellt und basieren auf den Ergebnissen von Sequenzbestimmungsarbeiten (M. Billeter und Mitarbeiter, persönliche Mitteilung).

taubt uns das Schema, einen Ueberblick über den Gesamtablauf des Infektionszyklus zu erhalten (Fig. 3.1).

- A. Der Phage heftet sich an seinen Rezeptor am Pilus einer "männlichen" (d.h. Hfr oder F⁺) E.coli Zelle. "Weibliche" (F⁻) E.coli Stämme sind resistent gegen RNA Phagen. Auf bis jetzt unbekannte Weise nimmt die Virus-RNA ihren Weg ins Innere der Zelle. Gemäss Untersuchungen am MS2 bleibt das Maturationsprotein des infizierenden Phagen hierbei an die RNA gebunden (Kozak & Nathans, 1971).
- B. Die virale RNA dient als "Messenger" für die Synthese der viralen Proteine. Eines dieser Proteine ist eine Untereinheit der phagen-spezifischen RNA-abhängigen RNA-Polymerase ("Replikase").
- C. Die Polymerase verwendet die parentale RNA als Matrize für die Synthese komplementärer RNA-Stränge ("Minus-Stränge"). Diese dienen wiederum als Matrize für die Herstellung grosser Mengen viraler RNA ("Plus-Stränge").
- D. Die neusynthetisierten Plus-Stränge finden ihrerseits Verwendung als Messenger-RNA. Virale RNA- und Proteinsynthese fahren fort, bis sich grosse Mengen der Phagenkomponenten in der Zelle anhäufen.
- E. Die Komponenten vereinigen sich spontan zu einer grossen Zahl von Phagen. Im Elektronenmikroskop werden intrazellulär parakristalline Anordnungen von Partikeln sichtbar.
- F. Die Zelle lysiert, wobei die Phagen freigesetzt werden. Pro Zelle werden ca. 5×10^4 Partikel ausgeschüttet, wovon allerdings nur 5-10 % infektiös sind.

Von den genannten Prozessen befassen sich die mittleren, nämlich die Proteinsynthese, die RNA-Synthese und die Partikelbildung, mit dem Aufbau der Phagenstruktur. Diese Vorgänge sind heute in vitro mit gereinigten Komponenten nachvollziehbar und daher einer weitgehenden experimentellen Manipulation zugänglich. Demgegenüber ist, infolge des Fehlens von in vitro Experimentiermöglichkeiten, unser Verständnis der für die Infektion und für die Lyse verantwortlichen Mechanismen bedeutend weniger weit fortgeschritten. Der Schwerpunkt

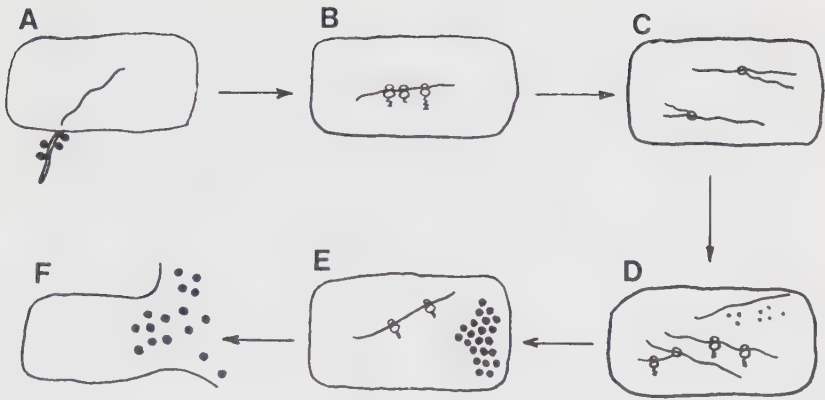


Fig. 3.1. Der Infektionszyklus des Bakteriophagen Q β

Erläuterungen siehe Text. Symbole: • Ribosomen; ○ Replikase;

•• Phagenproteine; ~ Phagen-RNA; ● Phagen.

unserer weiteren Diskussion wird daher vorwiegend bei den erwähnten Aufbauprozessen liegen.

Sowohl von prinzipieller wie auch von praktischer Bedeutung ist die Tatsache, dass es gelingt, eine Infektion auch mit reiner, vom Proteinmantel befreiter Phagen-RNA herbeizuführen. Man bedient sich hierfür Wirtszellen, welche durch Behandlung mit Lysozym und EDTA in Sphaeroplasten übergeführt und dadurch für RNA durchlässig gemacht worden sind. Diese Art der Infektion hat zwar nur einen äusserst geringen Wirkungsgrad (nur 1 von etwa 10^6 RNA-Molekülen ist erfolgreich), die im infizierten Sphaeroplasten ablaufenden Prozesse sind jedoch völlig normal, und die Phagenausbeute pro Zelle ist dieselbe wie bei der gewöhnlichen Infektion.

Die Infektivität der Phagen-RNA ist ein klarer Beweis dafür, dass die gesamte für den Phagen-Replikationszyklus benötigte Information in der Phagen-RNA vorhanden ist (der obenerwähnte Befund, wonach bei der Infektion Maturationsprotein zusammen mit der RNA in die Zelle transportiert wird, betrifft also offensichtlich keinen für den Infektionszyklus essentiellen Vorgang). Besonders eindrücklich wird dies durch die Tatsache illustriert, dass auch in vitro hergestellte Phagen-RNA volle Infektivität aufweist (siehe Abschnitt 4.2). Es konnte übrigens beim R17-System gezeigt werden, dass ein ähnlicher Infektionsprozess an intakten F^+ -Zellen mit Komplexen von Maturationsprotein und Phagen-RNA möglich ist (Iglewski, 1976), was wiederum die Rolle des Maturationsproteins beim Adsorptions- und Penetrationsschritt unterstreicht.

4. DIE REPLIKATION DES VIRUS-GENOMS

4.1. Das Auftreten von komplementärer "Minus-Strang" RNA in infizierten Zellen

4.1.1. Das "Replicative Intermediate"

Infiziert man E.coli-Zellen mit Phagen, deren RNA radioaktiv markiert ist, und versucht dann zu verschiedenen Zeiten nach Infektion die radioaktive "parentale" RNA durch Phenolextraktion zurückzuisolieren, so stellt man fest, dass bereits 6 bis 8 Minuten nach Infektion eine

signifikante Fraktion (8-10 %) der parentalen RNA in einer neuen Form vorliegt, welche gegen den Abbau mit Ribonuklease weitgehend beständig ist (Weissmann & al., 1964). Im Verlauf des Infektionszyklus kann eine erhebliche Menge virus-spezifischer RNA in Form von teilweise RNase-resistenten Strukturen nachgewiesen werden. Der RNase-resistente Teil dieser RNA zeigt das an DNA erinnernde charakteristische thermische Denaturierungs- und Renaturierungsverhalten, welches auf die Auflösung bzw. Neubildung der Doppelhelix-Anordnung zurückzuführen ist, und wurde auf Grund eingehender physikalisch-chemischer Untersuchungen einschliesslich der Röntgendiffraktions-Analyse eindeutig als doppelhelicale RNA identifiziert (Langridge & al., 1964). In Experimenten mit radioaktiven Vorläufern schienen sich die partiell doppelsträngigen Strukturen wie Zwischenprodukte der RNA-Synthese zu verhalten, weshalb sie als "replicative intermediate" (RI-RNA) bezeichnet wurden. Es handelt sich dabei vorwiegend um Komplexe, bei welchen mehrere unfertige Plusstrang-Ketten an eine Minusstrang-Kette gebunden vorliegen. Genaueren Aufschluss über die Natur der Zwischenprodukte der Replikation erhielt man durch in vitro Untersuchungen (siehe Abschnitt 4.2).

4.1.2. Die Isolierung von Minusstrang-RNA

Ausgehend von RI-RNA gelang es Pollet & al. (1967), intakte Minusstränge in reiner Form zu isolieren. Das Prinzip der Abtrennung bestand darin, dass das Gemisch von Plus- und Minus-Strängen nach Denaturierung in Gegenwart eines grossen Ueberschusses von fragmentierter Plusstrang-RNA renaturiert wurde (Fig. 4.1). Die hierbei entstandenen Doppelstrangstrukturen, welche überwiegend Minusstränge in an kurze Plusstrang-Fragmente gebundener Form enthielten, konnten auf chromatographischen Weg von einzelsträngiger RNA, nämlich den überschüssigen Plusstrang-Fragmenten sowie den aus dem RI verdrängten Plussträngen, abgetrennt werden. Hitzedenaturierung der Doppelstrang-Strukturen ergab ein Gemisch von intakten Minus-Strängen (Sedimentationskonstante 30 S) und Plusstrang-Fragmenten (12 S), welches durch Sedimentation im Sucrosegradienten mit Leichtigkeit aufgetrennt werden konnte. Die auf über 90 % angereicherte Minusstrang-RNA wurde schliesslich in einem weiteren Reinigungsschritt praktisch vollständig rein erhalten.

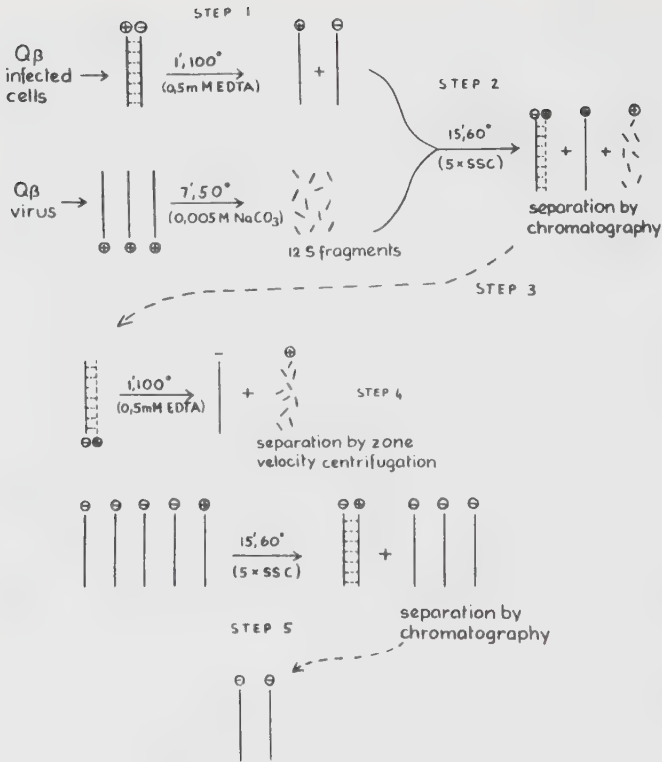


Fig. 4.1. Methode der Herstellung reiner Minusstrang-RNA

Doppelstrang-RNA aus $Q\beta$ -infizierten Zellen wird nach Hitzedenaturierung (1 min 100° ; Schritt 1) mit einem Ueberschuss von fragmentierter Plusstrang-RNA renaturiert (Schritt 2). Geeignete RNA-Fragmente (Sedimentationskonstante 12 S) lassen sich durch milden Alkali-Abbau aus Phagen-RNA herstellen. Das renaturierte Gemisch wird durch Chromatographie an Cellulose in eine einsträngige und eine doppelsträngige Fraktion aufgetrennt (Schritt 3). Die Doppelstrangfraktion wird wieder hitzedenaturiert, und die intakte Minusstrang-RNA (30 S) wird von den freigesetzten Plusstrang-Fragmenten (12 S) durch Zonen-zentrifugation im Sucrosegradienten abgetrennt (Schritt 4). Die kleine Menge noch vorhandener Plusstrang-RNA wird in einem weiteren Renaturierungsschritt (Schritt 5) in doppelsträngige Form überführt und durch nochmalige Chromatographie an Cellulose entfernt (aus Weissmann & al., 1968).

Die Untersuchung der Eigenschaften der Minusstrang-RNA ergab, dass diese, im Gegensatz zu viraler Plusstrang-RNA, im Sphaeroplasten-Versuch keine Infektivität aufwies. Auch als mRNA im in vitro protein-synthetisierenden System war der Minusstrang völlig inaktiv. Hingegen stellte er sich als eine ausserordentlich wirksame Matrize für die in vitro RNA-Synthese durch das Q β -spezifische Replikationsenzym (Q β Replikase, siehe Abschnitt 4.2) heraus, mit deren Hilfe grosse Mengen voll infektiöser, d.h. genetisch intakter viraler Plusstrang-RNA synthetisiert werden konnten (Feix & al., 1968).

Obgleich die Idee ursprünglich nicht allgemein Anklang fand (Haruna & Spiegelman, 1966), kann heute kein Zweifel mehr darüber bestehen, dass es sich bei der Minusstrang-RNA um einen obligaten Zwischenträger der genetischen Information im Replikationsprozess der RNA-Phagen handelt. Weitere überzeugende Evidenz hierfür stammt aus in vitro Arbeiten, welchen wir uns im nächsten Abschnitt zuwenden wollen.

4.2. Die Replikation von Q β RNA in vitro

4.2.1. Frühe Arbeiten

Wie bereits erwähnt, gelang es Haruna & Spiegelman (1965) aus dem zellfreien Extrakt von Q β -infizierten E.coli eine RNA-freie Enzymfraktion anzureichern, mit welcher sich die Replikation von Q β RNA in vitro nachvollziehen liess und die deshalb Replikase genannt wurde. Die Syntheseaktivität war vollständig von der Zugabe von Q β RNA abhängig; keine andere virale oder zelluläre RNA wies als Matrize nennenswerte Aktivität auf (Präzisierungen zu diesen Feststellungen siehe Abschnitt 4.2.2). Das System unterschied sich von andern Polymerasen ferner dadurch, dass es autokatalytisch RNA synthetisierte, d.h. die neusynthetisierte RNA wurde freigesetzt und diente ihrerseits wieder als Matrize, so dass am Ende einer längeren Reaktion die Menge der synthetisierten RNA die Menge der eingesetzten Matrizen-RNA bei weitem überstieg. Die synthetisierte Q β RNA war in keiner Hinsicht unterscheidbar von der aus Phagen isolierten und wies, wie schon erwähnt, volle Infektivität auf.

Die Untersuchung der Zwischenprodukte dieser in vitro RNA-Synthese ergab, dass auch hier die Replikation der Phagen-RNA über die Synthese eines Komplementärstrangs erfolgt. Ausserdem wurde klar, dass im aktiven, aus Enzym, Matrizie und Produkte-RNA bestehenden Replikationskomplex ("40 S-Komplex") die RNA nicht wie vorher angenommen in partiell doppelhelicaler, sondern in freier, fast vollständig RNase-empfindlicher Form vorliegt (Weissmann & Feix, 1966). Erst bei der Deproteinisierung mit Phenol geht der Komplex in eine dem "Replicative Intermediate" entsprechende, teilweise RNase-resistente Struktur über. Auf Grund dessen ist also das RI nicht als ein echtes Zwischenprodukt der RNA-Synthese, sondern eher als Artefakt der RNA-Isolierung aufzufassen. Damit steht im Einklang, dass partiell doppelsträngiges RI weder von Replikase als Matrizie verwendet werden kann, noch Infektivität im Sphaeroplastentest aufweist; erst nach Hitzedenaturierung treten Matrizenaktivität und Infektivität auf. Auch die hohe Syntheseaktivität von Replikase mit gereinigten Minussträngen als Matrizie, sowie die Tatsache, dass normalerweise ein beträchtlicher Teil des in vitro synthetisierten 30 S Produkts aus freien Minussträngen besteht, deutet darauf hin, dass die Rolle des eigentlichen Zwischenprodukts nicht von einer Doppelstrangstruktur, sondern vom freien Minusstrang übernommen wird (Weissmann & al., 1968).

4.2.2. Wirtsfaktor HF und Matrizenspezifität

Die Frage, ob ein und dasselbe Enzym sowohl den Plus- als auch den Minusstrang synthetisiert, blieb lange Zeit ungewiss. Erst als es gelang, Enzympräparate von höherem Reinheitsgrad herzustellen, konnte das Problem einer Lösung nähergebracht werden. Einen ersten Schritt in dieser Richtung unternahmen August und Mitarbeiter (August & al., 1968; Eoyang & August, 1968), die ein verbessertes Isolierungsverfahren ausarbeiteten und hierbei feststellten, dass für die volle in vitro Replikationsaktivität nicht nur das phageninduzierte Enzym, sondern ein weiteres, von der Wirtszelle beigesteuertes Protein, der sog. Wirtsfaktor ("Host-Factor" HF), benötigt wird (Franze de Fernandez & al., 1968). Es handelt sich um ein hitzestabiles Protein vom Mole-

kulargewicht 72,000 (6 Untereinheiten vom MG 12,000), das in der Wirtszelle in erheblicher Menge vorkommt und dort neueren Befunden zufolge an die Ribosomen assoziiert ist (Carmichael, 1975). Seine zelluläre Funktion ist noch ungeklärt. Der Faktor stimuliert die Phagen-spezifische, vom Plusstrang gesteuerte Minusstrang-Synthese auf den bis zu 10-fachen Wert, übt jedoch auf die Synthese von Plusstrang-RNA keinen Einfluss aus. In vitro Untersuchungen zeigten, dass diese Stimulation den Initiationsschritt der Synthese betrifft (siehe Abschnitt 4.2.3) und dass der Wirtsfaktor eine stöchiometrische Wechselwirkung mit Q β -Plusstrang-RNA eingeht.

Während die relative Menge von synthetisierter Plus- und Minusstrang-RNA in einem in vitro Reaktionsgemisch sehr stark von der Konzentration des HF-Proteins abhängt, wird dieses Verhältnis in vivo höchstwahrscheinlich nicht auf diese Weise reguliert, da der Faktor intrazellulär stets in sättigender Konzentration vorliegen dürfte. Gemäss heutiger Auffassung wird das Verhältnis von Plus- zu Minusstrang-Synthese in der Zelle (ca. 10 : 1) vorwiegend durch die Konzentration an freien Minus- resp. Plusstrang-Matrizen bestimmt, die um das gleiche Enzym konkurrieren. Minusstränge dienen bekanntlich weder als mRNA noch werden sie in Partikel verpackt; sie stehen deshalb während viel längerer Zeit als Matrizen zur Verfügung als Plusstränge. Endgültig fallengelassen wurde die Zwei-Enzym-Hypothese allerdings erst, als die Untereinheiten-Struktur der Replikase aufgeklärt war (Abschnitt 4.4.1).

Zur Frage der Matrizenspezifität war schon 1967 die Feststellung gemacht worden, dass auch gewisse synthetische Polynukleotide von Replikase als Matrize verwendet werden (Hori & al., 1967; Eikhom & Spiegelman, 1967). Polycytidylsäure (Poly C) und sogar statistische Copolymere mit hohem Cytidylsäure-Gehalt werden von Replikase in einer Wirtsfaktor-unabhängigen Reaktion abkopiert, wobei das Produkt als Komplementärstrang in doppelsträngiger Form an die Matrize gebunden bleibt. Obwohl es sich bei dieser Reaktion also nicht um eine Replikation im Sinne einer Matrizen-Vermehrung handelt, erschien es zu-

nächst paradox, dass ein Enzymsystem, das ausser Q β Plus- und Minusstrang RNA keine andere virale oder zelluläre RNA als Matrize annimmt, nicht auch gegen die erwähnten synthetischen Polynukleotide diskriminiert (siehe auch Abschnitt 4.5.)

Weiter zeigte es sich, dass auch das oben erwähnte Prinzip der Matrizenabhängigkeit der Replikase-Reaktion nicht ohne Ausnahmen zutrifft (Banerjee & al., 1969). Die meisten Enzympräparate haben nämlich die Fähigkeit, wenn sie mit den vier Nukleosid-Triphosphaten, aber ohne Matrize inkubiert werden, nach kürzerer oder längerer Wartezeit eine neue, noch heute rätselhafte Art von RNA zu synthetisieren. Diese RNA ist längenmässig relativ uniform mit einer Sedimentationskonstante von etwa 6 S, sequenzmässig aber heterogen und ohne Homologie mit Q β -RNA. Obwohl die Nukleotidsequenzen von nicht weniger als drei verschiedenen gereinigten 6 S-Spezies bisher aufgeklärt wurden (Mills & al., 1973; Mills & al., 1975; Schaffner & al., 1977), stehen wir in bezug auf die Herkunft und die Bedeutung dieser RNA-Moleküle immer noch völlig im Dunkeln.

4.2.3. Initiation und Synchronisation der in vitro RNA-Synthese

Die Arbeiten von Billeter & al. (1969 A, 1969 B) eröffneten neue Perspektiven insbesondere in bezug auf die Anwendungsmöglichkeiten des Q β -Replikase-Systems: Es erwies sich als möglich, die in vitro-Synthese experimentell in einen Synchronisationsschritt und eine Elongationsphase aufzutrennen. Dies gelingt dadurch, dass man die Inkubation des Replikase-Systems zunächst in Gegenwart von nur GTP und ATP (beide hochgereinigt und frei von anderen Triphosphaten) ausführt, solange bis alle zur Initiation befähigten Replikase-Moleküle initiiert haben, was bei sättigenden Triphosphat-Konzentrationen und Standard-Inkubationsbedingungen bei 37⁰ nach ca. 5 Minuten der Fall ist. Die Synthese der neuen Ketten kann dabei nur bis zu dem Punkt voranschreiten, wo das erste CTP oder UTP eingesetzt werden müsste. Das auf diese Weise synthetisierte Initiationsfragment wird bei Verwendung von Plusstrang-RNA als Matrize 14 Nukleotide lang, mit Minusstrang-RNA be-

trägt seine Länge 5 Nukleotide (Fig. 4.2). Zugabe von UTP und CTP resultiert dann in einer weitgehend synchronen Elongation der initiierten Ketten.

Dass für den Initiationsschritt sowohl GTP wie ATP als Substrate eingesetzt werden, hat seinen Grund darin, dass ein Initiations-Komplex mit GTP als einzigem Substrat eine Art "Schlupf"-Polymerisation zeigt, wobei Poly-G-Ketten von erheblicher Länge synthetisiert werden, welche übrigens teilweise noch elongiert werden können (Mekler & Billeter, 1975). Durch Zugabe von ATP wird diese Reaktion vollständig unterbunden. Analoge Phänomene sind auch bei anderen Polymerasen, z.B. DNA-Polymerase I, bekannt (Kornberg, 1974).

Die Bedeutung des Synchronisationsverfahrens erhöht sich noch dadurch, dass ein Inhibitor der Replikase gefunden wurde, der spezifisch den Initiationsschritt, nicht aber die Elongationsreaktion hemmt. Dieser Inhibitor ist Polyaethylensulfat, abgek. PES (Kondo & Weissmann, 1972A). Die Substanz war schon zuvor bei RNA-Polymerase in analoger Weise wie Heparin oder Rifampicin als Initiationshemmer zur Verwendung gelangt (Chambon & al., 1967). Durch Zugabe von PES nach erfolgreichem Initiationsschritt kann also erreicht werden, dass zu keinem späteren Zeitpunkt durch freigesetztes Enzym eine Neu-Initiation stattfinden kann.

Eine zusätzliche Erweiterung der experimentellen Möglichkeiten ergab sich ausserdem, als es gelang, Replikationskomplexe durch Gelfiltration vollständig von ihren Substraten, den Nukleosid-Triphosphaten, abzutrennen, und in einem zweiten Schritt durch Zugabe von neuen Triphosphaten zur Weiterführung der Synthese zu veranlassen.

Von den mannigfachen Anwendungen dieser verschiedenen Arbeitstechniken seien hier erwähnt:

1. Die synchronisierte Synthese kurzer, ^{32}P -markierter 5'-terminaler Segmente von Plus- und Minus-Strang RNA zwecks Bestimmung der Nukleotidsequenz (Billeter & al., 1969 A, 1969 B).



Fig. 4.2. Synchronisation der RNA-Synthese an Q β Plus- und Minusstrang-Matrizen in Abwesenheit von CTP und UTP.
Der schraffierte Kreis bedeutet Q β Replikase.

2. Schrittweise Elongation von Initiationskomplexen durch Zugabe von einzelnen (oder Kombinationen von 2 oder 3) Triphosphaten zwecks Sequenzbestimmung (Bandle, 1973).
3. Verwendung der schrittweisen Elongation zur Einführung von Substrat-Analogen und gezielten Mutationen (Flavell & al., 1975; Domingo & al., 1976; Taniguchi & Weissmann, 1978).
4. Synthese von RNA-Ketten, welche in definierten Abschnitten radioaktiv markiert sind, und deren Verwendung zur Kartierung von RNA-Fragmenten (Hindley & al., 1970; Weber & al., 1972; F. Meyer, 1978).

4.3. Der Terminations-Schritt und die Rolle der 3'-terminalen Nukleosid-Reste

Eine der bis heute nicht befriedigend gelösten Fragen betrifft das Paradox der 3'-ständigen Endgruppe von Phagen-RNAs (Weber & Weissmann, 1970). Für die Bestimmung solcher Endgruppen steht eine Reihe von Methoden zur Verfügung. Eine der einfachsten und zugleich empfindlichsten bedient sich der selektiven Oxidation der vicinalen Glycolgruppierung des 3'-terminalen Ribose-Rests mit Natriumperjodat (Fig. 4.3); Reduktion des entstandenen Dialdehyds mit tritiiertem Kaliumborhydrid von hoher spezifischer Radioaktivität, gefolgt von alkalischer Hydrolyse, erlaubt den Nachweis und die Charakterisierung des selektiv mit Tritium markierten 3'-terminalen Nukleosid-Derivats im Picomol-Massstab. Die Methode ist allerdings infolge des gelegentlichen Auftretens stark tritiumhaltiger Nebenprodukte nicht völlig problemlos und kann bei unkritischer Verwendung zu Artefakten Anlass geben (Leppa & al., 1968).

Endgruppenbestimmungen an RNA-Phagen mit Hilfe dieser (sowie auch anderer) Methoden in verschiedenen Laboratorien ergaben, wie auch bei einem grossen Teil aller untersuchten Tier- und Pflanzenviren, vorwiegend Adenosin als 3'-ständiges Nukleosid (> 90 %), daneben gewöhnlich auch eine kleine Menge Cytidin (5-10%). Aus in vitro-Versuchen ist nun aber bekannt, dass sowohl Plus- wie Minusstränge am 5'-Termini-

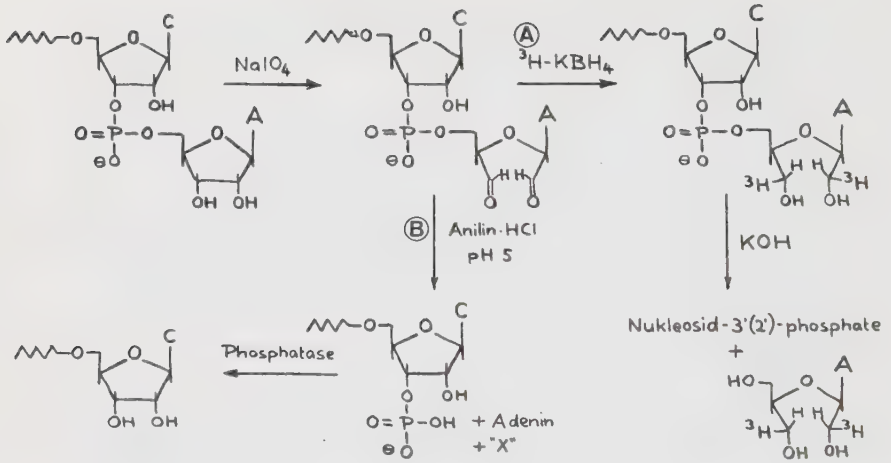


Fig. 4.3. Bestimmung und Elimination der 3'-Endgruppe einer RNA

Der mit Natriumperjodat selektiv zum Dialdehyd oxidierte 3'-terminale Nukleosid-Rest kann (A) durch Reduktion mit ^3H Kaliumborhydrid radioaktiv markiert werden; nach alkalischer Hydrolyse wird der markierte Nukleosid-Trialkohol chromatographisch identifiziert. Andererseits führt Behandlung des Dialdehyds mit primären Aminen zur Abspaltung des terminalen Nukleosid-Rests durch β -Elimination (B). Die 3'-Phosphatgruppe wird mit alkalischer Phosphatase entfernt.

nus mit einem Guanosin-Triphosphat-Rest anfangen. Es bleibt deshalb nichts anderes übrig, als anzunehmen, dass das 3'-ständige Adenosin nicht durch einen Basenpaarungs-Mechanismus eingesetzt wird.

Die Rolle dieser Endgruppe wurde noch unklarer, als aus Arbeiten verschiedener Laboratorien (Kamen, 1969; Rensing & August, 1969; Weber & Weissmann, 1970) hervorging, dass das terminale Adenosin für die Infektivität der RNA gar nicht notwendig ist. In Anwendung einer bereits früher entwickelten chemischen Methode (Steinschneider & Frankel-Conrat 1966) gelingt es, RNAs schrittweise vom 3'-Ende her abzubauen (Fig. 4.3.). Behandelt man nämlich den obenerwähnten Dialdehyd mit Anilin oder andern Aminen, so erfolgt eine Eliminationsreaktion, bei welcher die um das terminale Nukleosid verkürzte RNA als Produkt erhalten wird. Die RNA trägt nun eine 3'-ständige Phosphatgruppe, welche leicht enzymatisch entfernt werden kann, so dass die RNA für einen weiteren Oxydations- und Eliminationszyklus zur Verfügung steht.

Derartige Experimente an Phagen-RNAs (R17 und Q β) ergaben zunächst, in Uebereinstimmung mit früheren Befunden, dass dem terminalen Adenosin mindestens zwei bis drei Cytidin-Reste vorausgehen. Sehr überraschend war aber sodann der Befund, dass die Phagen-RNA nach einem Eliminationszyklus, das heisst nach Entfernung der terminalen Adenylsäure-Rests, noch volle Infektivität aufwies. Erst die Abspaltung des zweiten Nukleotids, eines Cytidylsäure-Rests, führte zu einem drastischen Abfall der Infektivität. R. Kamen (1969) zeigte auch, dass die Abspaltung des terminalen Adenylsäure-Rests keine erbliche Veränderung der R17 RNA darstellt: die Nachkommen einer Sphaeroplasten-Infektion mit 3'-Adenosin-freier R17 RNA trugen überwiegend wieder ein Adenosin am 3'-Ende ihrer RNA.

Der naheliegende Gedanke, der überzählige Adenosin-Rest sei das Resultat einer postreplikativen Modifikation der Phagen-RNA, möglicherweise durch ein Wirts-Enzym, musste bald wieder aufgegeben werden, nachdem die Suche nach einer solchen Aktivität in E.coli-Extrakten erfolglos verlaufen war und insbesondere die tRNA-spezifische Adenylat-Cytidylat-Pyrophosphorylase mit Phagen-RNA keine Aktivität aufwies.

Ausserdem zeigte es sich (Rensing & August, 1969; Weber & Weissmann, 1970), dass das in vitro Replikationssystem von Q β sich der in vivo-Situation völlig analog verhielt: Die Matrizenaktivität von Q β RNA war nach Entfernung der terminalen Adenylsäure-Gruppe unvermindert, und erst die Entfernung des zweiten Nukleotids führte zu einer Aktivitätsabnahme. Ausserdem trug das in Gegenwart von 3'-Adenylsäure-freier Q β RNA erhaltene in vitro-Produkt wiederum überwiegend Adenosin als 3'-Terminus. Das gleiche in vitro-System war jedoch nicht fähig, in 3'-Adenylsäure-freier Q β RNA das fehlende Nukleotid zu ersetzen.

Es konnte auch ausgeschlossen werden, dass der Wirts-Faktor (HF) eine Rolle bei der Addition des 3'-terminalen Adenylsäure-Rests spielt, denn auch die in Abwesenheit von Faktor ausgeführte in vitro-Synthese mit Minussträngen (genauer: denaturiertem RI) als Matrize führte zu einem Produkt mit vorwiegend 3'-A Terminus. Schliesslich ergab eine Endgruppenbestimmung an (in vivo synthetisierter) Q β -Minusstrang-RNA ebenfalls vorwiegend Adenosin am 3'-Terminus, so dass es unwahrscheinlich erscheint, dass die Natur des 3'-Endes irgend etwas mit der Diskriminierung zwischen den beiden Strängen, z.B. mit der Regulation der relativen Mengen an Plus- und Minusstrang-RNA zu tun hat (Weber & Weissmann, 1970).

Bei Berücksichtigung aller Befunde drängt sich der Schluss auf, dass der terminale Adenylsäure-Rest vom Replikationsenzym selbst sowohl an Plus- und an Minusstränge angehängt wird, und zwar im Sinne einer Terminations- oder Freisetzungs-Reaktion, wobei die 3'-Adenylat-freie RNA nicht als freies Zwischenprodukt auftritt, sondern im Replikase-RNA-Komplex gebunden bleibt. Diese Hypothese ist zwar durchaus nicht unwahrscheinlich, hat aber den schwerwiegenden Nachteil, dass sie schwierig zu beweisen ist.

Aus der Untersuchung der nicht Q β -spezifischen Synthese-Aktivitäten von Replikase ergeben sich leider keinerlei diesbezügliche Hinweise. Bei der Poly C-abhängigen Poly G-Synthese durch Q β Replikase werden in Gegenwart von ATP die Ketten nicht durch Einführung eines Adenylsäure-Rests terminiert (H. Weber, unveröffentlicht). Dies sagt aber

nicht notwendigerweise etwas aus über den normalen Terminations-Mechanismus, da das Poly G-Produkt ohnehin im Gegensatz zur Q β -spezifischen Synthese in doppelsträngiger Form an die Matrize gebunden bleibt. Ueber ein weiteres Syntheseprodukt von Q β -Replikase, nämlich 6S-RNA, gibt es in bezug auf die 3'-Enden gegensätzliche Befunde: Rensing & August (1969) erwähnen Adenosin als Endgruppe, während Mills & al. (1973, 1975) am 3'-Ende ihrer beiden vollständig sequenzierten 6S-RNA-Spezies ein Cytidin finden. Die Sequenzbestimmung der 6S RNA aus unserem eigenen Labor zeigte eindeutig das Vorhandensein eines A-Terminus an beiden komplementären Strängen (Schaffner & al., 1977).

Die Schwierigkeit des Problems liegt offensichtlich darin, dass versucht werden muss, bei der RNA-Synthese zwischen Elongationsschritten und einem hypothetischen Terminations-Schritt zu unterscheiden, wobei aber beide Schritte dasselbe Substrat, nämlich ATP, verwenden, und ausserdem kein freies Zwischenprodukt auftritt. Prinzipielle Möglichkeiten, diese Frage zu bearbeiten, wären beispielsweise: a) die Auffindung von terminationsspezifischen Inhibitoren; b) die Konstruktion einer synthetischen, mit Ausnahme des 3'-Endes adenosinfreien Matrizen-RNA, welche von Replikase repliziert und in einsträngiger Form freigesetzt werden kann. Beide Wege haben allerdings so geringe Erfolgschancen, dass meines Wissens bis heute niemand versucht hat, in dieser Richtung weiter vorzustossen.

4.4. Die Untereinheitenstruktur von Q β -Replikase

4.4.1. Anzahl, Grösse und genetischer Ursprung der Untereinheiten

Das durch die von August beschriebene Reinigungsprozedur erhältliche Replikase-Enzym zeigt auch bei noch weitergehender Reinigung immer ein Minimum von 4 Proteinbanden in der SDS-Polyacrylamid-Elektrophorese (Kamen, 1970; Kondo & al., 1970). Die aufgrund der Elektrophoreseschwindigkeit geschätzten Molekulargewichte der 4 Proteine sind wie folgt: α 74,000; β 67,000; γ 47,000; δ 33,000. Im Zusammenhang mit diesem Befund ergaben sich nun folgende zwei Schwierigkeiten:

- a) Nimmt man an, dass es sich bei allen vier Proteinen um virusspezifische Untereinheiten der Replikase handelt, so reicht die Länge der Q β -RNA (4220 Nukleotide) nicht aus, um für eine derartige Menge von Protein zu codieren.
- b) Das aus den 4 Untereinheiten errechnete Molekulargewicht von 221,000 ist nur schlecht mit dem Sedimentationskoeffizienten von $S_{20,w} = 6.7$ vereinbar, der normalerweise für ein globuläres Protein des ungefähren Molekulargewichts von 130,000 gefunden wird.

Das erste Problem wurde gegenstandslos, als gezeigt werden konnte, dass nur eine einzige Untereinheit, nämlich β , ein virusspezifisches Protein darstellt; die anderen Untereinheiten werden von der Wirtszelle zur Verfügung gestellt (Kondo & al., 1970; Kamen, 1970).

Der Beweis hierfür wurde folgendermassen erbracht: von zwei Kulturen von E.coli Zellen wurde die eine kontinuierlich mit ^{35}S markiert, die andere erst mit Q β infiziert und dann mit ^{35}S markiert. Beide Kulturen wurden mit je der 100fachen Menge einer nicht-radioaktiv markierten Q β -infizierten Kultur gemischt; aus den beiden Ansätzen wurde Replikase separat aufgearbeitet. Bei der elektrophoretischen Auftrennung der Untereinheiten fand man die Radioaktivität des Enzympräparats aus infizierten, markierten Zellen ausschliesslich in der β -Untereinheit: das aus der Mischung mit nichtinfizierten, radioaktiven Zellen erhaltene Enzympräparat enthielt dagegen die Radioaktivität ausschliesslich in den Untereinheiten α , γ und δ .

Neben der Charakterisierung der β -Untereinheit als einzigem viralem Enzymprotein weist das Ergebnis des Versuchs noch auf eine weitere Eigenschaft der Replikase, nämlich auf die leichte Austauschbarkeit der wirtsspezifischen Untereinheiten. Die Annahme eines schnellen Dissoziations-Gleichgewichts zwischen den Untereinheiten liefert eine mögliche Erklärung für die zweite oben erwähnte Schwierigkeit, nämlich den abnormal tiefen Sedimentationskoeffizienten.

4.4.2. Replikase ohne α -Untereinheit

In diesem Zusammenhang muss auch erwähnt werden, dass das durch Zentrifugation im Sucrose-Gradienten als homogene 6.7 S Bande erhältliche Enzym normalerweise nicht der stöchiometrischen Zusammensetzung entsprechende Mengen der 4 Untereinheiten enthält: gewöhnlich ist die α -Untereinheit im Unterschuss vorhanden. Durch Gel-Exklusionschromatographie des gereinigten Enzyms auf Agarose gelingt es, die Enzymaktivität in zwei Komponenten A und B aufzulösen (Kamen & al., 1972). Die zuerst eluierte Fraktion A enthält stöchiometrische Mengen der 4 Untereinheiten α , β , γ und δ und verhält sich in bezug auf Matrizespezifität und alle andern Eigenschaften wie normale Replikase. Fraktion B enthält dagegen nur die Untereinheiten β , γ und δ ; mit Q β Minusstrang-RNA, poly C oder 6S RNA als Matrize weist sie die gleiche spezifische Aktivität auf wie normale Replikase, hingegen zeigt sie eine stark verminderte Fähigkeit, Q β Plusstrang-RNA als Matrize zu verwenden. Diese letztere Aktivität beträgt bei tiefer Ionenstärke ca. 10 % von der des normalen Enzyms; sie kann durch mässige Erhöhung der Salzkonzentration (0.1 M KCl) auf praktisch Null reduziert werden, unter Bedingungen, welche die Aktivität des normalen Enzyms nicht beeinträchtigen. Verschiedene Argumente, unter anderem auch Bindungsstudien (Abschnitt 4.5.) sprechen dafür, dass Replikase ohne α -Untereinheit eine verminderte Affinität für Q β Plusstrang-RNA besitzt. Durch Zugabe von gereinigter α -Untereinheit zur Komponente B werden in dieser alle Eigenschaften der normalen Replikase voll wiederhergestellt.

Diese Befunde erscheinen in gewissem Sinne paradox, deuten sie doch darauf hin, dass ausgerechnet eine wirtsspezifische Untereinheit bei der spezifischen Interaktion von Replikase mit der Phagen-RNA eine entscheidende Rolle spielt (siehe Abschnitt 4.5.). Eine analoge Aussage gilt natürlich auch für den Wirtsfaktor HF.

4.4.3. Die Funktionen der an der phagenspezifischen RNA-Synthese beteiligten Wirtsproteine in der uninfizierten Wirtszelle

Die Proteine, welche die Wirtszelle als Untereinheiten an die Q β -Replikase beisteuert, konnten in der uninfizierten Zelle lokalisiert und eindeutig identifiziert werden. Auffälligerweise handelt es sich bei allen drei fraglichen Untereinheiten wiederum, wie beim Wirtsfaktor HF, um Proteine, welche an Ribosomen assoziiert sind. Die grösste Untereinheit, α , wurde zunächst mit einem sog. "Faktor i" identifiziert (Groner & al., 1972), der sich später als das Protein S1 der 30S Ribosomen-Untereinheit entpuppte (Wahba & al., 1974). Das Protein spielt eine essentielle Rolle bei der Bindung des Ribosoms an die mRNA. Im Ueberschuss vorhanden hat es die Eigenschaft, die Initiation der in vitro-Proteinsynthese an gewissen Cistrons, z.B. dem Hüllprotein-Cistron von MS2, zu hemmen, während die Initiation an anderen Cistrons, z.B. von T7 mRNA, eher stimuliert wird. Das S1-Protein bindet kräftig an synthetische Polynukleotide wie Poly A, Poly U und Poly C und hemmt spezifisch die in vitro-Translation von Polypyrimidinen, nicht jedoch von Poly A. Besonders interessant erscheint hier, dass der Wirtsfaktor HF in seinen Wechselwirkungen mit Polynukleotiden ganz ähnliche Eigenschaften aufweist, indem er wie S1 an alle Homopolymere bindet, aber spezifisch nur die von Poly A gesteuerte Aminosäurekorporation zu hemmen imstande ist. Man kann daher vermuten, dass diese zwei Wirtsproteine, welche beide bei der Erkennung der viralen RNA durch die Replikase eine Rolle spielen, auch für die Wirtszelle spezifische RNA-Erkennungsfunktionen auszuüben haben, und dies höchstwahrscheinlich im Zusammenhang mit der Proteinsynthese.

Die genaue Rolle und insbesondere der Wirkungsmechanismus dieser beiden Spezifitätsfaktoren bei der viralen RNA-Synthese wie auch bei der bakteriellen Proteinsynthese ist noch unklar. Denkbar wäre, dass bei der Bindung der Proteine an eine RNA deren Sekundärstruktur in einer Weise verändert wird, dass im Falle von Q β eine starke spezifische Bindung und die Initiation durch Replikase ermöglicht wird, während andererseits die Wechselwirkung einer Anzahl von RNAs mit dem Ribosom je nachdem eine Hemmung oder eine Stimulation erfahren kann.

Die beiden verbleibenden Replikase-Untereinheiten γ und δ erwiesen sich schliesslich als identisch mit den Elongationsfaktoren EF-Tu und EF-Ts (Blumenthal & al., 1972), welche bei der Proteinsynthese die Aufgabe haben, die mit Aminosäuren beladenen Transfer-RNAs an die Akzeptorstelle auf dem Ribosom zu binden.

Die Fähigkeit von EF-Tu, GTP zu binden, sowie Resultate mit Replikase aus einer Mutante mit temperaturempfindlichem EF-Ts führten zunächst zur Annahme, die Rolle von EF-Tu/Ts sei auf die Initiationsphase der Synthese beschränkt und bestehe in der Bindung des ersten GTP-Moleküls (Hori & al., 1974). Weitere Arbeiten, unter anderem mit für EF-Tu/Ts spezifischen Inhibitoren und Antikörpern, deuten jedoch darauf hin, dass die GTP-Bindung bei der Aktivität dieser Untereinheiten in Replikase keine essentielle Rolle spielt, dass aber andererseits EF-Tu/Ts auch bei der Elongationsreaktion wichtig sind (Blumenthal & al., 1976; Carmichael & al., 1976; Brown & Blumenthal, 1976).

4.5. Das Problem der Erkennung von Q β RNA durch Replikase

4.5.1. Matrizenspezifität und 3'-terminale Sequenzen

Eine der auffälligsten Eigenschaften der Q β -Replikase ist ohne Zweifel ihre ausgeprägte Selektivität in bezug auf die zu replizierende Matrize. Wie bereits erwähnt, ist das Enzym unter den normalerweise verwendeten Reaktionsbedingungen vollständig inaktiv auf allen zellulären und viralen RNAs, mit Ausnahme von Q β Plus- und Minusstrang-RNA. Eine eigentliche Replikation (d.h. eine Vermehrung der Matrizen-RNA) ist ferner möglich mit gewissen in vitro-Produkten, nämlich verkürzten Q β -Varianten (Mills & al., 1967) sowie 6S RNA (siehe Abschnitt 4.2.2.; Banerjee & al., 1969). Schliesslich ist das Enzym auch noch fähig, Komplementärstränge zu Poly-C und anderen Cytidylat-reichen synthetischen Polynukleotiden zu synthetisieren (Hori & al., 1967).

Unter gewissen Bedingungen ist es möglich, die Matrizenspezifität des Enzyms herabzusetzen. So zeigte es sich, dass in Gegenwart von Mangan-Ionen (zusätzlich zum üblichen Magnesium) eine Reihe von anderen natürlichen RNAs (virale RNAs, ribosomale RNA, tRNA) abkopiert werden, wobei die Initiation immer durch GTP erfolgt (Palmenberg und Kaesberg, 1974) und die Reaktion nach Synthese eines Komplementärstrangs zum Stillstand kommt. Ferner verliert Replikase jegliche Selektivität, wenn der Initiationsschritt umgangen wird, indem man einen "Primer", d.h. ein initiierendes, einem Teil der Matrize komplementäres Oligonukleotid zur Verfügung stellt (Feix und Hake, 1975). Unabhängig von diesen künstlichen Reaktionen bleibt aber die Frage bestehen, was für ein Mechanismus unter natürlichen Bedingungen für die erwähnte beinahe absolute Selektivität der Replikase verantwortlich ist, welche dafür sorgt, dass in der infizierten Zelle ein einziges virales RNA-Molekül von Replikase erkannt und repliziert wird.

In diesem Zusammenhang ist der Verdacht naheliegend, dass gewisse Strukturelemente am 3'-Ende der Q β RNA für die Erkennung durch Replikase eine Rolle spielen, denn dort muss ja die Synthese des Komplementärstrangs ihren Anfang nehmen. Unterzieht man die 3'-Termini der verschiedenen als Matrize verwendbaren RNAs einer Prüfung im Hinblick auf gemeinsame

Sequenzelemente (Fig. 4.4.), so fällt auf, dass alle diese RNAs, inklusive natürlich Poly C, an dieser Stelle eine Anzahl - mindestens 3 - G-Reste aufweisen (das terminale A ist offensichtlich für die Erkennung bedeutungslos, siehe Abschnitt 4.3.). Die Genugtuung über diesen Befund wird allerdings getrübt durch die Tatsache, dass eine ganze Anzahl weiterer viraler RNAs (Fig. 4.4.) das gleiche Strukturmerkmal zeigen, ohne für Replikase als Matrize verwendbar zu sein. Die Vermutung drängt sich auf, dass die 3'-terminale Oligo-C-Sequenz für die Erkennung zwar notwendig, aber nicht hinreichend ist, und dass auch gewisse im Innern der RNA befindliche Strukturmerkmale für eine produktive Matrizeninteraktion unerlässlich sind.

Der Vorschlag von Küppers und Sumper (1975), wonach zwei Oligo-C Sequenzen in definiertem Abstand am 3'-Ende die entscheidenden Spezifitätsdeterminanten darstellen, ist wenig überzeugend, denn einerseits ist er nur ungenügend experimentell belegt, andererseits steht er nicht nur im Widerspruch zu mehreren kürzlich bestimmten 6S-RNA Sequenzen, sondern auch zur Sequenz des 3'-Endes von Q β Plusstrang RNA (vgl. Schaffner & al., 1977).

4.5.2. Matrizenaktivität von fragmentierter Q β RNA

In diesem Zusammenhang sind Resultate von Interesse, welche von M. Schwyzer (1973) bei der Untersuchung der Matrizenaktivität von RNA-Fragmenten erzielt wurden. Entgegen früheren Aussagen stellte es sich heraus, dass Intaktheit keine Voraussetzung dafür ist, dass Q β RNA als Matrize verwendet werden kann. Zwar kann fragmentierte Q β RNA verständlicherweise nicht wie intakte RNA über mehrere Replikationsrunden zur Synthese bedeutender Mengen neuer RNA Anlass geben, da ja an der Fragmentierungsstelle keine normale Termination möglich ist und die Replikationskomplexe sehr wahrscheinlich dort blockiert werden. Bei der Messung der Brutto-RNA-Synthese werden aus diesem Grunde mit fragmentierter RNA als Matrize im Vergleich zu intakter RNA verschwindend kleine Werte erhalten. Bestimmt man jedoch statt dessen die Matrizenkompetenz durch Messung der Initiation der RNA-Synthese (in Abwesenheit von CTP und UTP), so zeigt es sich, dass fragmentierte Q β RNA nur wenig hinter intakter Q β RNA zurücksteht, sofern die Fragmente eine Mindestlänge

RNAs MIT MATRIZENAKTIVITÄT:

$Q\beta$	$\left\{ \begin{array}{l} \oplus \\ \ominus \end{array} \right.$	$5' \dots CUUUGCCCUCUCUCCUCCCA_{OH} 3'$	(Weissmann & al., 1973)
		$\dots CCCC UAAAGGGGGGUCCCA_{OH}$	
6S:WS I	$\left\{ \begin{array}{l} \oplus \\ \ominus \end{array} \right.$	$\dots GAUCUAGCCGGGUCAACCCA_{OH}$	(Schaffner & al., 1977)
		$\dots CUGGUAACAGGAUUUCCCA_{OH}$	
6S:MIDI	$\left\{ \begin{array}{l} \oplus \\ \ominus \end{array} \right.$	$\dots CCCCCGAAGGGGGGUUCCCC_{OH}$	(Mills & al., 1973)
		$\dots CCCCCUCCGGGGGGUCCCC_{OH}$	
6S:MICRO	$\left\{ \begin{array}{l} \oplus \\ \ominus \end{array} \right.$	$\dots UAAAGCUGAGGUUUUAACCC_{OH}$	(Mills & al., 1975)
		$\dots CUCCACGUGGCCAACUCCC_{OH}$	

RNAs OHNE MATRIZENAKTIVITÄT:

MS2	$\dots GCUUGGCUAGUACCACCCA_{OH}$	(Fiers & al., 1976)
TMV	$\dots GUUACCCCGGUAGGGGCCCA_{OH}$	(Guilley & al., 1975)
16S rRNA	$\dots GCGGUUGGAUACCUCUUA_{OH}$	(Ehresmann & al., 1975)

Fig. 4.4. Vergleich 3'-terminaler Nukleotidsequenzen von RNAs mit und ohne Matrizenaktivität für $Q\beta$ Replikase.

Abkürzungen: Midi: 6S RNA "Midivariant".

Micro: 6S RNA "Microvariant".

TMV: Tabakmosaikvirus.

16S rRNA: 16S ribosomale RNA von E.coli

von ca. 2000 Nukleotiden (entsprechend einer Sedimentationskonstante von ca. 20 S) aufweisen. Verwendung noch kürzerer Fragmente führt in Gegenwart von Wirtsfaktor HF zu einem sehr steilen Abfall der Matrizenaktivität auf praktisch Null, während ohne Faktor der Aktivitätsrückgang viel weniger ausgeprägt ist und insbesondere Fragmente mit einer Sedimentationskonstante von unter 10 S wieder eine bedeutende Zunahme der Matrizenaktivität aufweisen. Bei der Sequenzanalyse an den durch sehr kurze, synchronisierte radioaktive Pulse erhaltenen Produkten der verschiedenen Fragmentreaktionen stellte es sich heraus, dass die Initiation an 20 S Fragmenten (mit oder ohne Faktor) ausschliesslich am ursprünglichen 3'-Terminus der Q β RNA erfolgt war, mit andern Worten, dass keine Initiation an internen Stellen oder an den durch Fragmentierung entstandenen neuen 3'-Enden möglich ist. Dagegen ergab die Untersuchung der mit kurzen (<10 S) RNA-Fragmenten erhaltenen Produkte, dass unter diesen Bedingungen (ohne HF) ein komplexes Gemisch von Initiationssequenzen synthetisiert wird. Offensichtlich dienen nun auch andere als die ursprünglichen 3'-Termini als Initiationsstellen, die Spezifität der Initiation ist verlorengegangen. Damit steht im Einklang, dass unter diesen Bedingungen auch Fragmente von MS2 RNA, ja sogar (in geringerem Ausmass) von ribosomaler RNA zu offensichtlich unspezifischer Initiation führen.

Die hier diskutierten Resultate bestätigen die im vorigen Abschnitt geäusserte Vermutung, dass gewisse im Innern der Q β RNA vorliegende Strukturen für die spezifische Matrizen-Replikase-Wechselwirkung verantwortlich sein müssen, und erlauben die Voraussage, dass diese Strukturmerkmale nicht weit von der Mitte des Q β RNA-Moleküls, ungefähr 2500 Nukleotide vom 5'-Ende weg, zu finden sein sollten.

4.5.3. Untersuchungen an Bindungskomplexen

4.5.3.1. Die Bindungs-Reaktion

Studien über die Bindungsreaktion zwischen Replikase und radioaktiv markierter RNA, und über die Struktur der resultierenden Bindungskomplexe ermöglichten weitere Aussagen zur Wechselwirkung zwischen diesen beiden Reaktionspartnern. August (August & al., 1968) bemerkte als erster,

dass Replikase mit Q β RNA eine starke Bindung eingeht und dass der Komplex durch Filtration an Nitrocellulosefilter ("Millipore") gebunden werden kann. Dass trotz dieser einfachen experimentellen Messmethodik bisher keine befriedigende quantitative Erfassung dieser Bindungsreaktion möglich war, ist darauf zurückzuführen, dass das System sich in vielerlei Hinsicht nicht ideal verhält, und zwar aus folgenden Gründen:

- a) Der Wirkungsgrad, mit welchem die Komplexe auf dem Nitrocellulosefilter zurückgehalten werden, ist schwer genau zu bestimmen und ist wahrscheinlich von mehreren experimentellen Variablen abhängig (z.B. Verhältnis Protein-RNA, aber auch Filtrationsgeschwindigkeit etc.), welche nur zum Teil standardisiert werden können. Dies sowie die Tatsache, dass infolge der grossen Empfindlichkeit der RNA ein gewisses, ebenfalls variables Ausmass an Fragmentierung vor und während der Reaktion unvermeidlich ist, führt dazu, dass auch bei Verwendung von Enzym-Ueberschuss immer nur ein Teil (60-80 Prozent) der eingesetzten radioaktiven RNA ans Filter gebunden wird.
- b) Replikase, auch im höchstgereinigten Zustand, verhält sich inhomogen gegenüber Q β RNA, was sich unter anderem darin äussert, dass bei der in vitro RNA-Synthese immer nur ein kleiner Teil (ca. 10-20 Prozent) der Replikase-Moleküle imstande ist, die Synthese zu initiieren. Bei der Bindungsreaktion zeigt sich die Inhomogenität darin, dass ein gewisser Anteil der Komplexe, ca. 50 Prozent, die radioaktive RNA in einer reversibel gebundenen Form enthält, der Rest der RNA ist anscheinend irreversibel gebunden und lässt sich weder durch Zugabe eines grossen Ueberschusses nichtradioaktiver RNA noch durch Behandlung mit 1 M Natriumchlorid freisetzen (R. Kamen, unveröffentl.). Hier stehen übrigens die Resultate unseres Laboratoriums im Widerspruch zu denjenigen von Silverman (1973), der angibt, nur in Gegenwart von GTP die Bildung von salzresistenten Komplexen feststellen zu können.

Angesichts dieser Schwierigkeiten war es bis heute nicht möglich, Komplexbildungskonstanten oder auch nur die Stöchiometrie der Komplexe zuverlässig zu messen. Bezüglich der Affinität der Reaktionspartner zueinander wurde immerhin übereinstimmend gefunden, dass im Kompetitionsversuch die Affinität der Replikase zu Q β RNA 5-10mal grösser ist als zu irgend einer andern RNA (inbegriffen andere Phagen-RNAs) und dass die Bildung von "irreversiblen" Komplexen wenn überhaupt so nur in sehr viel geringerem Ausmass mit heterologer RNA möglich ist. Was die Stöchiometrie betrifft, so wird allgemein für die spezifische Interaktion die Bildung eines 1:1 Komplexes angenommen; viele Erfahrungen weisen jedoch daraufhin, dass insbesondere bei Enzymüberschuss auch ein unspezifisches Anhaften von mehreren Enzymmolekülen an eine RNA-Kette auftritt.

4.5.3.2. Ribonuklease-Abbau von Bindungskomplexen

4.5.3.2.1. Prinzip der Methode

Eine eher qualitative Art der Fragestellung ist diejenige nach den Stellen auf der RNA, welche mit Replikase in direkte Interaktion treten. Ein einfaches Arbeitsprinzip für solche Probleme besteht darin (Fig. 4.5.), dass man ^{32}P -markierte RNA für die Komplexbildung einsetzt und den Komplex einem Abbau mit einer Ribonuklease unterzieht. Vorausgesetzt, dass die Stabilität des Komplexes durch die Fragmentierung mit RNase nicht zu sehr beeinträchtigt wird, lassen sich dann aus dem Fragment-Komplex RNA-Segmente isolieren, welche die Stellen direkten Kontakts zwischen RNA und Protein repräsentieren. Von den jeweiligen Bedingungen des Nuklease-Abbaus hängt es ab, ob man dabei von einer eigentlichen Protektion oder eher von einer selektiven Retention im Fragment-Komplex reden kann. Die isolierten Bindungsfragmente können mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt und der Sequenzbestimmung und Kartierung zugeführt werden. Diese allgemeine Versuchsanordnung hatte sich bereits bei der Sequenzbestimmung und Lokalisierung der ribosomalen Bindungsstellen (Hindley & Staples, 1969; Steitz, 1969) bewährt und ist seit den ersten Resultaten im Q β -Replikase-System auch in einer Reihe von andern Systemen (Phagen-RNA-Hüllprotein: Bernardi & Spahr,

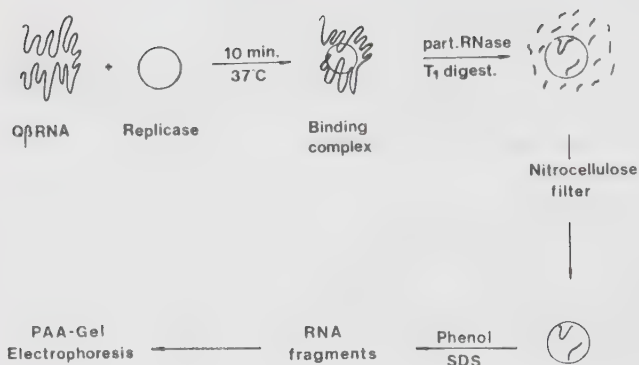


Fig. 4.5. Prinzip der Untersuchung von Qβ RNA-Replikase-Komplexen durch Ribonuklease-Abbau und Charakterisierung der proteingebundenen RNA-Fragmente

Bindungskomplexe zwischen [^{32}P] Qβ RNA und Replikase werden durch Inkubation der beiden Komponenten in einem geeigneten Puffer hergestellt und anschliessend einem milden Abbau durch Ribonuklease T₁ unterworfen. Das Reaktionsgemisch wird auf Nitrocellulose-Filter abfiltriert, wobei proteingebundene RNA-Fragmente am Filter haften bleiben, nichtgebundene Fragmente frei passieren und ausgewaschen werden. Extraktion der Filter mit einem Phenol-Puffer-Gemisch liefert nach Zentrifugation in der wässrigen Phase die an Replikase haftengebliebenen [^{32}P] RNA-Fragmente, welche durch Elektrophorese auf Polyacrylamid-Gelen aufgetrennt und autoradiographisch nachgewiesen werden können (aus Meyer, 1978).

1972; Weber, 1976. Operator-Repressor: Gilbert & Maxam, 1973; Pirrotta, 1975. RNA-Polymerase-Promotor: Pribnow, 1975) verwendet worden.

Um unspezifische Interaktionen möglichst zu vermeiden, wurde in den Versuchen mit Q β RNA und Replikase stets eine sättigende (oder nahezu sättigende) [^{32}P] RNA-Menge eingesetzt, gewöhnlich im Gewichtsverhältnis ca. 2 zu 1 über Replikase (dass dieses Verhältnis nicht besser den stöchiometrischen Verhältnissen entspricht, hängt offenbar wiederum mit der schon erwähnten Heterogenität der Replikase zusammen). Ausserdem wurde eine mögliche sekundäre Bindung von schon fragmentierter [^{32}P] RNA während des Nuklease-Abbaus verhindert durch Verdünnung und Zugabe eines 20-50fachen Ueberschusses von nicht-radioaktiver Q β RNA ins Abbau-Gemisch. Für die Abbau-Reaktion wurde Ribonuklease T $_1$ verwendet und die Bedingungen empirisch jeweils so ausgesucht (2-10 Min bei 25 $^{\circ}$, 1 Einheit T $_1$ RNase/ μg RNA), dass in der nachfolgenden elektrophoretischen Analyse mit guter Ausbeute ein möglichst spezifisches Muster von RNA-Fragmenten einer Grösse von 20-150 Nukleotiden und wenig unverdautes Material erhalten wurde. Kontrollversuche zeigten einerseits, dass unter den gewählten Bedingungen auch die freie Q β RNA immer nur einen partiellen Abbau erlitt, andererseits, dass bei einer Verschärfung der RNase-Behandlung die Ausbeute an RNA-Fragmenten deutlich abnahm. Beides lässt darauf schliessen, dass Replikase den gebundenen RNA-Fragmenten wahrscheinlich keinen ausgeprägten Schutz vor der Ribonuklease bietet. Die Isolierung der abgebauten Komplexe erfolgte, wie schon bei den obenerwähnten Bindungsversuchen, durch Filtration auf Nitrocellulosefilter. Extraktion der Filter im Phenol-Puffer-Gemisch ergab dann mühelos die proteinfreien RNA-Fragmente.

4.5.3.2.2. Einfluss der Reaktionsbedingungen

Die ersten Bindungsversuche (Weber & al., 1972) wurden unter Puffer-Bedingungen ausgeführt, die den für die in vitro-Synthese von Q β RNA verwendeten möglichst ähnlich waren, nämlich in Gegenwart von 80 mM Tris-HCl, pH 7.5, und 12 mM Magnesiumchlorid. Der Abbau des Komplexes erfolgte mit T $_1$ -Ribonuklease nach Verdünnung mit einem 10-20fachen Volumen 0.15 M NaCl; 0.015 M Na-Citrat, pH 7 (1 x SSC). Das auf diese

Fig. 4.6. Autoradiogramme der elektrophoretischen Analyse von [^{32}P] Q β RNA-Fragmenten aus dem nukleolytischen Abbau von [^{32}P] Q β RNA-Replikase-Komplexen

A. Ursprünglich verwendete Bedingungen (Weber & al., 1972)

[^{32}P] Q β RNA (22 μg) und Q β Replikase (18 μg) in 80 mM Tris $\cdot$ HCl, pH 7.5, 12 mM MgCl_2 , 1 mM EDTA (0.1 ml) wurden 3 min bei 37 $^\circ$ inkubiert. Die Mischung wurde verdünnt mit einer Lösung (2 ml) von 400 Einh. RNase T $_1$ und 800 μg unmarkierter Q β RNA in 0.15 M NaCl, 0.015 M Na-Citrat, pH 7 (1xSSC), welche zuvor 2 min bei 25 $^\circ$ vorinkubiert worden war. Das Gemisch wurde 2 min bei 25 $^\circ$ inkubiert, dann auf 0 $^\circ$ gekühlt und langsam durch ein "Millipore"-Filter (HAWP 0.45 μm) filtriert. Nach 5-maligem Waschen mit kaltem 1xSSC wurde das Filter extrahiert durch Schütteln mit 4 ml einer 1:1 Mischung von Phenol und 20 mM Tris $\cdot$ HCl, pH 7.5, 2 mM EDTA, 0.5 % Na-Dodecylsulfat, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Hefe-Träger-RNA während 5 min bei 50 $^\circ$. Nach Abkühlen auf 0 $^\circ$ und Zentrifugation (5 min 10 000 rpm) wurde die wässrige Phase abgehoben, in welcher sich nun 80-90 % der Radioaktivität befand. Zugabe von 5 M Kochsalzlösung (Endkonz. 0.1 M) und 2 vol Alkohol führte zur Präzipitation der RNA innert einiger Stunden bei -25 $^\circ$. Nach dem Abzentrifugieren (20 min 10 000 rpm, 0 $^\circ$), Waschen und Trocknen (im Vakuum) wurde der Niederschlag in 50 μl einer Lösung von 10 % Sucrose und 0.05 % Bromphenolblau gelöst und auf ein 20-proz. Polyacrylamid-Gel (nach Peacock & Dingman, 1968) aufgetragen. Die Elektrophorese dauerte 6 h bei 300 V (für 17 cm lange Gelplatten). Autoradiographie mit Fuji Rx Röntgenfilm, Expositionszeit 30 min.

B, C. S-Bedingungen

[^{32}P] Q β RNA (100 μg) und Q β Replikase (45 μg) in 10 mM Tris $\cdot$ HCl, pH 7.5, 0.15 M NaCl, 2 mM Dithiothreitol (DTT), 0.2 mg/ml Rinder-Serum Albumin (vol 0.5 ml) wurden 8 min bei 37 $^\circ$ inkubiert. Verdünnung mit einer Lösung (2 ml) von 500 μg unmarkierter Q β RNA und 250 Einh. RNase T $_1$ in 10 mM Tris $\cdot$ HCl, pH 7.5, 0.15 M NaCl, dann 2 min Inkubation bei 25 $^\circ$. Filtration, spülen mit 10 mM Tris $\cdot$ HCl, pH 7.5, 0.15 M NaCl (S-Puffer). Weiterbehandlung des filtergebundenen Materials wie bei A. Elektrophorese auf 40 cm langen Gelplatten bei 800 V über Nacht. B und C sind identische Ansätze, deren Gelplatten verschieden lang exponiert wurden.

D. M-Bedingungen

Vorgehen wie bei B, C. aber Verwendung von 10 mM Tris $\cdot$ HCl, pH 7.5, 10 mM MgCl_2 , 2 mM DTT, 0.2 mg/ml Serum Albumin als Bindungspuffer. Für den Abbau (10 min 25 $^\circ$) 500 μg unmarkierte Q β RNA und 500 Einh. RNase T $_1$ in 10 mM Tris $\cdot$ HCl, pH 7.5, 10 mM MgCl_2 (2 ml) und zum Spülen ebenfalls 10 mM Tris $\cdot$ HCl, pH 7.5, 10 mM MgCl_2 (M-Puffer).

[^{32}P] Q β RNA wurde hergestellt nach Escarmis & al. (1978), mit einer spez. Radioaktivität bis zu 10 7 cpm/ μg . Q β Replikase (nach Kamen & al., 1972, spez. Aktivität 1200-2000 Einh./mg) wurde von C. Weissmann zur Verfügung gestellt.

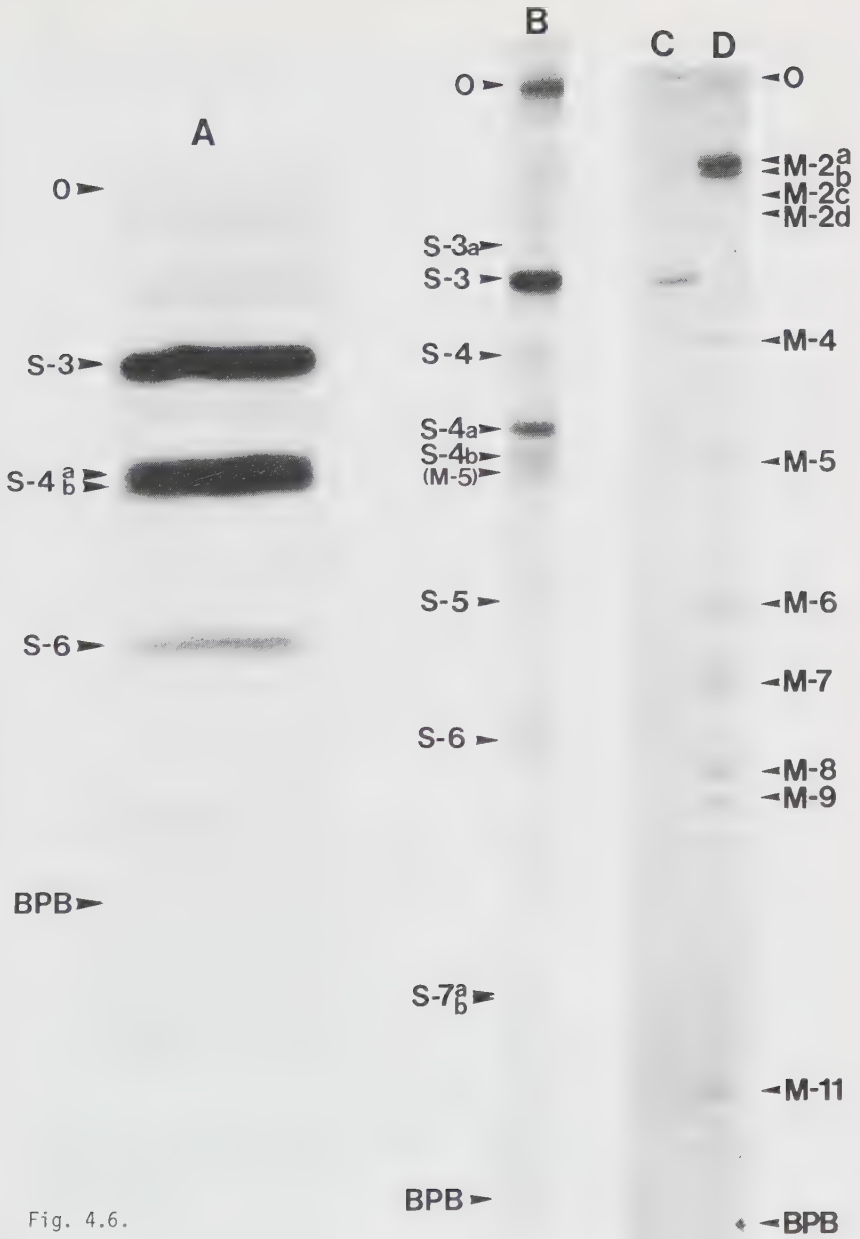


Fig. 4.6.

Weise erhaltene Fragmentgemisch ergab auf den Polyacrylamid-Gelen ein reproduzierbares Bandenmuster (Fig. 4.6.A). Fingerprint-Analysen an den gereinigten Fragmenten zeigten, dass mehrere hervorstechende Komponenten des Gemischs (z.B. S-4a, S-4b, S-6) Unterfragmente der stärkeren Bande S-3 darstellten. Daneben wurden aber auch immer wieder in veränderlicher Intensität Banden verschiedener Provenienz beobachtet.

Eine Vereinfachung des Fragmentmusters konnte dadurch erzielt werden (Weber & al., 1974), dass man auf den Zusatz von Magnesium-Ionen für die Bindungsreaktion verzichtete und statt dessen sowohl die Bindung wie den Abbau in 0.15 M NaCl-0.01 M Tris-HCl pH 7.5 ausführte ("S-Puffer", "S" abgek. für Salz). Infolge des im verwendeten Enzympräparat vorhandenen $MgCl_2$ (5 mM) ist die Mg^{++} Konzentration unter den genannten Bedingungen gleichwohl nicht null, aber weniger als 0.2 mM. In dem auf diese Weise erhältlichen "S"-Bandenmuster (Fig. 4.6.B,C) ist Bande S-3 noch vorherrschender als vorher. Die Unterfragmente S-4a, S-4b, S-6, etc. treten eher etwas in den Hintergrund; ausserdem tritt eine neue schwache Bande, S-3a, auf, deren Fingerprints neben den Flecken von S-3 noch einige zusätzliche Oligonukleotide aufweisen. Offensichtlich ist die Bindungsinteraktion unter diesen Bedingungen ausserordentlich spezifisch für eine einzige, durch die Fragmente dieser "S-Serie" charakterisierte Stelle auf dem Q β Genom.

Wählte man in bezug auf die Reaktionsbedingungen für Bindung und Abbau das entgegengesetzte Extrem, nämlich tiefe Konzentration an einwertigen Kationen und Zusatz von Mg^{++} (10 mM $MgCl_2$, 10 mM Tris-HCl, pH 7.5 = "M-Puffer"), so resultierte bei sonst gleichbleibendem Vorgehen (nur die RNase-Abbau-Bedingungen mussten ca. 5x verschärft werden) ein Fragmentmuster, das von dem in S-Puffer erhaltenen vollständig verschieden war (Fig. 4.6.D). Diese "M-Serie" enthält eine Reihe von Fragmenten, welche unter den ursprünglichen "gemischten" Bedingungen ebenfalls, wenn auch schwächer, vorhanden gewesen waren, nämlich die starke Fragmentgruppe M-2a-d (M-2a,c,d sind Unterfragmente von M-2b), sowie das Fragment M-5 (in variabler Menge auch unter S-Bedingungen als S-4c nachweisbar), welches weder mit M-2a noch mit S-3 gemeinsame Sequenzen aufweist.

Ebenfalls nicht verwandt mit irgendeiner bisher bekannten Sequenz ist das kurze Fragment M-11. Wie weiter unten (Abschnitt 4.5.3.2.4.) noch gezeigt wird, stammen aber die Fragmente der M-Serie ebenfalls aus einem eng begrenzten Bereich des Q β Genoms, so dass es sich rechtfertigt, von einer zweiten definierten Bindungsstelle, der "M-Stelle", auf der Q β RNA zu sprechen (Weber & al., 1974; Meyer & al., 1975; Vollenweider & al., 1976).

Eine Reihe von weiteren Variationen der Bindungsbedingungen und ihre Effekte sind in Tab. 4.1. zusammengefasst (Meyer & al., 1979). Interessant erscheinen insbesondere die folgenden Befunde:

- 1) Für das Erscheinen der S-Banden ist offensichtlich nur eine gewisse minimale Ionenstärke (0.05 - 0.1 M) verantwortlich, Kalium- oder Ammoniumionen haben die gleiche Wirkung wie Natriumsalze. Gegenwart von sowohl einwertigen Kationen als auch Magnesium führte zu einem Bandenmuster, das einer Ueberlagerung der S- und M-Banden entsprach. Unter Salz-Bedingungen, wie sie angenähert in vivo vorliegen und z.B. auch für die in vitro-Proteinsynthese verwendet werden (120 mM NH₄Cl, 6 mM MgCl₂, siehe Fig. 4.7.e) war offensichtlich sowohl die S- wie die M-Interaktion nachweisbar.
- 2) Die für S-Bedingungen typischen Banden wurden nur beobachtet, wenn der Komplex vor der Verdauung mehrere Minuten bei 37⁰ inkubiert wurde. Im Gegensatz dazu erhielt man das für M-Bedingungen charakteristische Bandenmuster auch von Komplexen, die bei 0⁰ hergestellt wurden. Die beiden Bindungsstellen unterscheiden sich also deutlich in der Kinetik der Bindungsreaktion (Fig. 4.7. a-d).
- 3) Die Gegenwart von PES führte unter M-Bedingungen zum vollständigen Verschwinden aller gebundenen RNA-Fragmente; unter S-Bedingungen wurde ein normales, wenn auch etwas abgeschwächtes Bindungsmuster erhalten. Es liegt nahe, diesen Effekt mit der Initiations-hemmenden Wirkung dieser Substanz in Verbindung zu bringen. Der Effekt von PES auf den Bindungskomplex wird im Abschnitt 4.5.3.2.6. eingehender diskutiert.

Expt. Nr.	Reaktionsbedingungen bei Komplex-Bildung	Reaktionsbedingungen bei Komplex-Abbau	Art der RNA-Fragmente
1	S (Puffer: 0.01 M Tris'HCl, 0.15 M NaCl)	S	S
2	M (Puffer: 0.01 M Tris'HCl, 0.01 M MgCl ₂)	M	M
3	S	S ohne Konkurrenz	S (+ diffuser Background)
4	M	M ohne Konkurrenz	M (+ diffuser Background)
5	S, mit 20 S Q β RNA-Fragmenten	S	S
6	M, mit 20 S Q β RNA-Fragmenten	M	M
7	S, 0°	S	(sehr schwach S)
8	M, 0°	M	M
9	S + PES (50 µg/ml)	S	S
10	M + PES (50 µg/ml)	M	stark reduzierte Bindung, keine M-Banden
11	M	S	S (+ schwach M)
12	M	0.15M KCl, 0.01 M Tris'HCl	S (+ schwach M)
13	M	0.15 M NaCl, 0.01 M MgCl ₂ , 0.01 M Tris'HCl	M + S
14	I (Puffer: 0.08M Tris'HCl, 0.012 M MgCl ₂ , 0.001 EDTA)	I	M (+ schwach S)
15	I	0.15 M NaCl, 0.015 M Na-Citrat (1xSSC)	S (+ schwach M)
16	0.006 M MgCl 0.12 M NH ₄ Cl 0.06 M Tris'HCl	0.006 M MgCl ₂ , 0.12 M NH ₄ Cl, 0.06 M Tris'HCl	M + S
17	0.01 M MnCl ₂ , 0.01 M Tris'HCl	0.01 M MnCl ₂ , 0.01 M Tris'HCl	neues Bandenmuster
18	S + GTP + ATP + HF	S	S
19	M + GTP + ATP + HF	M	M

Tabelle 4.1. Einfluss der Reaktionsbedingungen bei Herstellung und Abbau von Q β RNA-Replikase-Komplexen auf die Art der gebundenen RNA-Fragmente

Die Versuche wurden ausgeführt wie in der Legende zu Fig. 4.6. beschrieben, mit folgenden Modifikationen: Expt. 3,4: Die RNase T₁-Reaktion erfolgte ohne Zugabe von nichtmarkierter Q β RNA. Expt. 5,6: Anstelle von intakter [³²P] Q β RNA wurde leicht fragmentierte RNA vom ungefähren Sedimentationskoeffizienten 20 S eingesetzt. Expt. 18,19: Die Konzentration der Triphosphate betrug 0.4 mM und des Wirtsfaktors HF 100 Einh./ml. Der für die Komplexbildung verwendete Puffer (S-, M-, oder I-Bedingungen) enthielt ausserdem 2 mM DTT und 0.2 mg/ml Serum Albumin. Tris'HCl wurde immer auf pH 7.5 eingestellt.

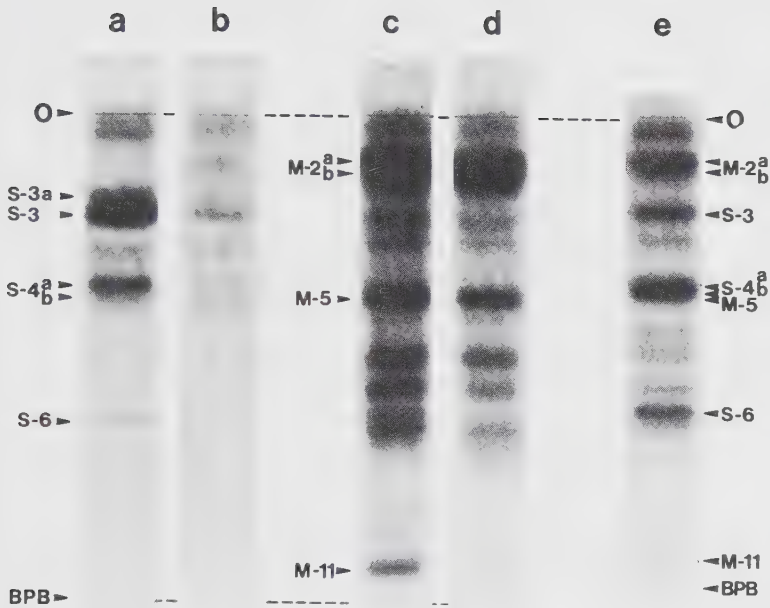


Fig. 4.7. Einfluss der Reaktionsbedingungen auf das Muster der von Replikase gebundenen Q β RNA-Fragmente

Die Ausführung der Versuche erfolgte nach dem in der Legende zu Fig. 4.6. beschriebenen Verfahren, mit Modifikationen wie in Tabelle 4.1. angegeben.

- a. S-Bedingungen (Tab. 4.1. Expt. 1).
- b. S-Bedingungen, Komplexbildung bei 0° (Tab. 4.1. Expt. 7).
- c. M-Bedingungen (Tab. 4.1. Expt. 2).
- d. M-Bedingungen, Komplexbildung bei 0° (Tab. 4.1. Expt. 8).
- e. "Ribosomenbindungspuffer": 60 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.12 M NH₄Cl, 6 mM MgCl₂ (Tab. 4.1., Expt. 16).

Die Fragmente wurden auf kurzen Polyacrylamid-Gelen (17 cm) elektrophoretisch aufgetrennt.

4.5.3.2.3. Sequenz, Lokalisierung und Funktion der S-Bindungsstelle

Für die am Fragment S-3 ausgeführten Sequenzbestimmungsarbeiten ergaben sich wesentliche Vereinfachungen einerseits durch die leichte Erhältlichkeit der genannten Unterfragmente, andererseits durch die Verwendung von in vitro mit den einzelnen Triphosphaten markierter RNA und Auswertung der "nearest neighbor"-Daten. Die vollständige Sequenz von S-3, inklusive seiner Unterfragmente und partiellen Abbauprodukte ist in Fig. 4.8.A dargestellt. Es stellte sich heraus (Weber & al., 1972), dass die Sequenz am 3'-Ende von S-3 mit einem Teil der Sequenz eines bereits früher aufgeklärten RNA-Abschnitts identisch ist; nämlich mit der 5'-terminalen Hälfte der Ribosomen-Bindungsstelle am Anfang des Hüllprotein-Cistrons (Hindley & Staples, 1969). Fragment S-3 umfasst 100 Nukleotide und ist auffällig reich an Uridylsäure-Resten (39 %). Das etwas längere, in schwacher Ausbeute anfallende Fragment S-3a enthält 10 zusätzliche Nukleotide auf der 3'-Seite von S-3 und damit praktisch die intakte ribosomale Bindungsstelle am Hüllprotein-Cistron. Der Vollständigkeit halber sind in Fig. 4.8.A ausserdem zwei Fragmente eingezeichnet, welche durch Abbau von Komplexen mit pankreatischer RNase anstelle von RNase T₁ (unter sonst gleichen Bedingungen) erhalten wurden. Ferner zeigt Fig. 4.8.B eine mögliche Sekundärstruktur der RNA in dieser Region.

Der Befund, dass Replikase und Ribosom an miteinander überlappenden Stellen der Q β RNA binden, erklärt den Mechanismus einer ungefähr gleichzeitig entdeckten neuen Funktion der Replikase als Translations-Repressor (Kolakofsky & Weissmann, 1971A). Eine detailliertere Diskussion dieser Funktion erfolgt im Kapitel über die Regulation der Proteinsynthese (Abschnitt 5.2.2.3.). Ausserdem ergeben sich nun zwei weitere Konsequenzen für die "S"-Bindungsstelle:

- a) Aufgrund der biochemischen Kartierung unter Verwendung der Puls-Chase Technik (Hindley & al., 1970) befindet sich die ribosomale Initiationsstelle für das Hüllprotein-Cistron, und damit die S-Bindungsstelle der Replikase, etwa 1100-1400 Nukleotide vom 5'-Ende der Q β RNA entfernt; diese Lokalisierung wurde für die S-Stelle durch

unabhängige Puls-Chase-Versuche bestätigt (Weber & al., 1972). Neueste Sequenz-Resultate von M. Billeter und Mitarbeitern (persönliche Mitteilung) zeigen, dass sich der Hüllprotein-Cistron-Anfang bei Nukleotid 1350 befindet, und stimmen im übrigen mit den RNA-Sequenzen der S-Fragmente voll überein.

- b) Da, wie weiter oben erwähnt, fragmentierte Q β RNA Moleküle von nur ca. 2000 Nukleotiden Länge noch volle Matrizenaktivität aufweisen, sofern sie ein intaktes 3'-Ende enthalten (Schwyzer, 1973), ergibt sich daraus, dass die S-Bindungsstelle für die Matrizenerkennung durch Replikase offensichtlich keine essentielle Rolle spielen kann, denn diese Stelle befindet sich ja in einer Entfernung von ca. 3000 Nukleotiden vom 3'-Ende. Bei der S-Bindungsinteraktion handelt es sich daher höchstwahrscheinlich um eine unabhängig von der RNA-Replikationsfunktion entwickelte regulatorische Funktion der Replikase. Als möglicherweise für die Matrizenerkennung essentielle interne Interaktionsstelle kommt deshalb nur die M-Region in Frage.

4.5.3.2.4. Lokalisierung und Sequenzen von Fragmenten der M-Serie

Die ungefähre Lokalisierung der M-Fragmente auf dem Q β -Genom erfolgte nach der bereits erwähnten Puls-Chase Technik, die schon für die Lokalisierung der Ribosomenbindungsstelle des Hüllprotein-Cistrons sowie auch der S-Fragmente zur Anwendung gekommen war (Hindley & al., 1970; Weber & al., 1972). Das Prinzip der Methode besteht darin, dass für den Abbau der Bindungskomplexe eine Serie von radioaktiven RNA-Präparaten verwendet wird, deren ³²P-Markierung sich ausgehend vom 5'-Ende bis zu einem variablen, aber bekannten Punkt auf dem Molekül erstreckt, der Rest des Moleküls ist nicht markiert (Fig. 4.9.A). Dasjenige partiell markierte RNA-Präparat mit dem kürzesten markierten Bereich, bei dem ein bestimmtes Fragment noch radioaktiv markiert auftritt, indiziert dann den Locus dieses Fragments. Die partiell markierten RNA-Präparate werden in einer Minus-Strang gesteuerten, synchronisierten in vitro-Reaktion (in Gegenwart von PES) hergestellt, wobei zu bestimmten, variablen Zeitpunkten der Plus-Strang-Synthese das radioaktive Triphosphat ("Puls") durch einen hohen Ueberschuss des nicht-markierten Substrats

Fig. 4.8. Nukleotid-Sequenzen der S-Fragmente

Die gereinigten S-Fragmente wurden gemäss Autoradiogramm (Fig. 4.6.) aus den Gelplatten ausgeschnitten, die Gelstücke zerkleinert und mit 3-4 vol 0.4 M NaCl in Gegenwart von 50 μ g Hefe-Träger-RNA 20 min bei 37° extrahiert. Nach kurzer Zentrifugation wurde der klare Ueberstand abgehoben und der Niederschlag noch 2 x in gleicher Weise extrahiert. Die Ueberstände wurden nacheinander durch eine kleine Kolonne (0.1 ml) von Sephadex G-10 filtriert, vereinigt und mit 2 vol Alkohol bei -25° ausgefällt. Die RNA wurde abzentrifugiert, gewaschen, getrocknet und zur Sequenzbestimmung nach Sanger & al. (1965) eingesetzt. Neben uniform markierter [32 P] Q β RNA kam auch RNA zur Verwendung, welche in vitro aus einem [α - 32 P] Nukleosidtriphosphat und drei unmarkierten Triphosphaten hergestellt worden war. Solche Präparate mit allen 4 Nukleosidtriphosphat-Einzelmarkierungen lieferten für die Sequenzbestimmung wichtige "nearest neighbor" Informationen. Eine genaue Beschreibung der Sequenzbestimmungsarbeiten findet sich in Meyer & al. (1979).

A. Sequenz der S-Region

Die im Autoradiogramm von Fig. 4.6. B sichtbaren Fragmente S-3a bis S-7b sind eingezeichnet, ebenso zwei Fragmente (SP-1 und SP-2), welche durch Abbau der Komplexe mit RNase A unter S-Bedingungen erhalten wurden. Ausserdem sind noch je zwei partielle Abbauprodukte des Fragments S-3 mit RNase T $_1$ (t5, t10) sowie mit RNase A (p9, p11) angegeben, welche bei der Sequenzbestimmung eine Rolle spielten. Auf der 3'-terminalen Seite der Sequenz befindet sich der Anfang des Hüllprotein-Cistrons; das Terminationstriplett für das A2-Cistron ist ebenfalls gekennzeichnet (term.).

B. Mögliche Sekundärstruktur des Fragments S-3

Die Freie Energie (ΔG) für die Bildung der grösseren Schleife beträgt -7-8 kcal, für die Bildung der kleineren Schleife ca. -15 kcal (nach Tinoco & al., 1973). Die Seitenschleife der letzteren ist willkürlich in einer von 4 möglichen, energetisch äquivalenten Positionen gezeichnet.

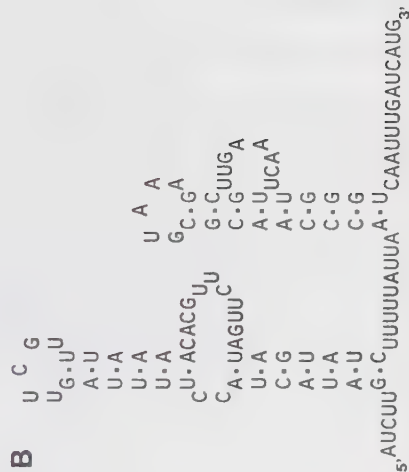
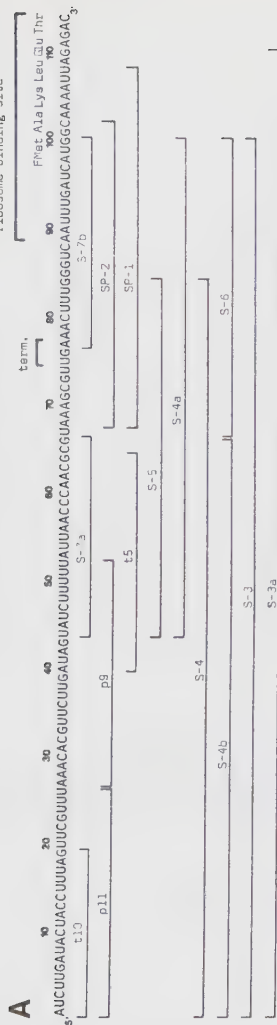


Fig. 4.8.

A

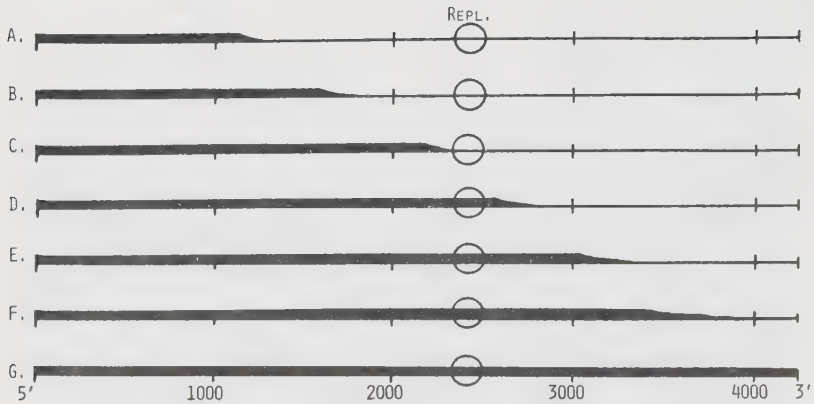


Fig. 4.9. "Puls-Chase"-Kartierung von RNA-Fragmenten der M-Serie

A. Schema der Bindungskomplexe mit partiell markierter RNA. Die markierten RNA-Segmente (dick ausgezogen) sind ungefähr massstäblich eingezeichnet.

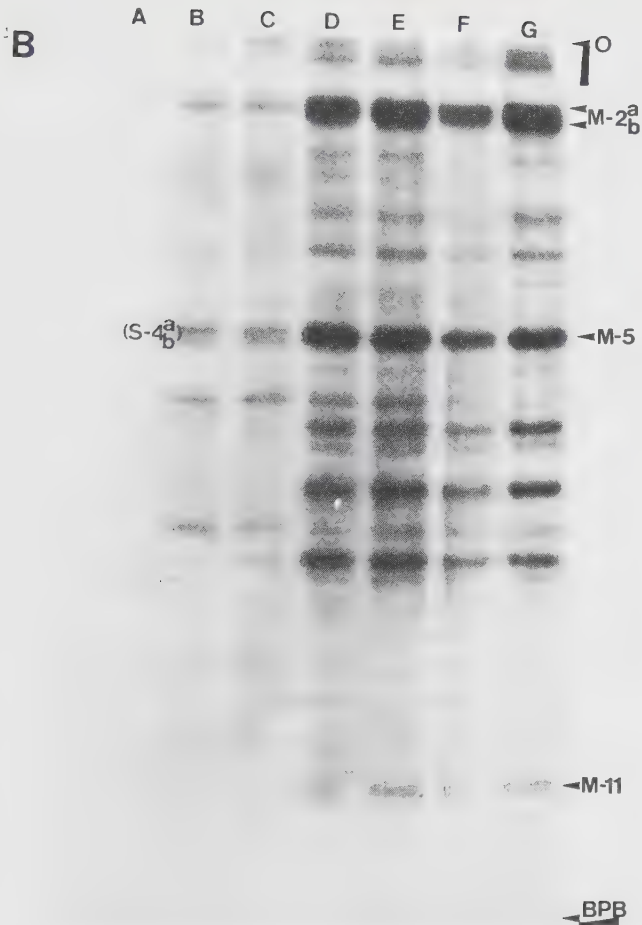


Fig. 4.9. Puls-Chase-Kartierung von RNA-Fragmenten der M-Serie

B. Autoradiogramm der elektrophoretischen Analyse von M-Fragmenten, hergestellt unter Verwendung partiell ^{32}P -markierter Q β RNA.

Zum Experimentellen siehe Meyer (1978), sowie Legende zu Fig. 4.6.
Weitere Erläuterungen im Text.

verdünnt und damit der Strang mit praktisch nichtradioaktiven Vorläufern zu Ende synthetisiert wird ("Chase"). Durch Sedimentationsanalyse von zum Zeitpunkt der Verdünnung entnommenen Proben kann die Länge des radioaktiven Segments in jedem Präparat bestimmt werden.

Im vorliegenden Fall wurden radioaktive "Pulse" von A. 40 sec, B. 65 sec, C. 90 sec, D. 115 sec, E. 140 sec, F. 175 sec Dauer ausgeführt und daraus radioaktive Bereiche einer ungefähren Länge von A. 1200 N., B. 1650 N., C. 2250 N., D. 2650 N., E. 3100 N., F. >3200 N. erhalten, ausserdem wurde uniform markierte (^{32}P) Q β RNA (4200 N.) als Kontrolle verwendet (G) (Weber & al., 1974; Meyer, 1978; Meyer & al., 1979). Die aus diesen verschiedenen Präparaten hergestellten M-Bindungsfragment-Muster sind in Fig. 4.9.B dargestellt. Es geht daraus klar hervor, dass die vorwiegend interessierenden Fragmente M-2 a,b, M-5 und M-11 zusammen im Präparat von Pulslänge 2650 N. erstmals voll auftreten und daher alle aus einem Bereich zwischen 2250 N. und 2650 N. vom 5'-Ende stammen müssen (die spurenweise sichtbare Radioaktivität der Region von M-2 und M-5 bei den kürzeren Pulsen wurde auf Grund ihrer Oligonukleotid-Analysen auf kontaminierende Fragmente anderer Provenienz zurückgeführt). In bezug auf die Genauigkeit der Bestimmung ist zu bemerken, dass neben der aus der Versuchsanordnung sich ergebenden Breite des resultierenden Bereichs und verschiedenen unsystematischen Fehlerquellen auch systematische Fehler angenommen werden müssen. Dies betrifft besonders die Abschätzung der Kettenlänge der pulsmarkierten RNA-Segmente, die unter nicht-denaturierenden Bedingungen in Sucrosegradienten durch Vergleich der Sedimentationsgeschwindigkeit mit derjenigen verschiedener Marker-RNAs (tRNA, 16 S und 23 S ribosomale RNAs, sowie Q β RNA) vorgenommen wurde. Tatsächlich sprechen verschiedene Hinweise dafür, dass die auf diese Weise ermittelten Werte ca. 10 Prozent zu tief liegen dürften. Das Resultat der Lokalisierungsexperimente steht somit im Einklang mit unserer früher erwähnten Vermutung, eine essentielle Interaktionsstelle dürfte sich im mittleren Teil der RNA, ca. 2000 Nukleotide vom 3'-Ende befinden.

Die Nukleotidsequenzen der Fragmente M-2, M-5 und M-11 in ihren wahrscheinlichen Sekundärstrukturen sind in Fig. 4.10. dargestellt (Meyer & al., 1975; Meyer, 1978; Meyer & al., 1979). Ihre Länge beträgt 173, 60 und 21 Nukleotide. Das längste Fragment weist auffällig wenig Möglichkeiten zur Sekundärstrukturbildung auf. Die Sequenzen zeigen keine Gemeinsamkeit mit irgendwelchen bisher bestimmten Q β -Sequenzen, insbesondere enthalten sie keine Ueberlappung mit den bekannten Sequenzen beim Anfang des Replikase-Cistrons, welcher in der Nähe liegen muss. Auf Grund der bisher erwähnten Daten konnte nicht mit Sicherheit entschieden werden, ob die M-Fragmente innerhalb des Replikase-Cistrons oder links davon zu lokalisieren sind, jedoch sprechen Resultate, welche bei der Kartierung grosser T₁-Oligonukleotide erhalten wurden, ganz klar für einen Ort rechts von der Initiationsstelle dieses Cistrons (M. Billeter, 1978).

Ueber die Reihenfolge der drei Fragmente und ihre Abstände war zunächst wenig bekannt. Vorläufige Resultate von F. Meyer an grösseren Q β RNA-Fragmenten deuteten darauf hin, dass M-5 innerhalb der ersten ca. 300 Nukleotide des Replikase-Cistrons liegt und dass M-2 sich rechts davon befinden muss. Ergebnisse an Komplementärstrang-Sequenzen dieser Region (W. Müller & H. Weber, unveröff., siehe Abschnitt 4.5.3.2.9.) schlossen zudem aus, dass die Fragmente M-2, M-5 und M-11 direkt aufeinanderfolgende Sequenzen darstellen. Andererseits traten alle drei Fragmente beim erwähnten Puls-Chase Versuch simultan und in konstanter relativer Intensität auf, was darauf hindeutete, dass die Abstände zwischen den Fragmenten nicht gross sein konnten.

Neue Sequenzresultate (M. Billeter & Mitarbeiter, persönliche Mitteilung), welche auch hier die Sequenzen der M-Fragmente bestätigten, zeigten überdies, dass M-5 bei Nukleotid 193 des Replikase-Cistrons beginnt und dass zwischen M-5 und M-2 ein Zwischenraum von 32 Nukleotiden, zwischen M-2 und M-11 ein Zwischenraum von 37 Nukleotiden vorliegt. Da der Anfang des Replikase-Cistrons sich etwa bei Nukleotid 2340 befindet, kommen die drei M-Fragmente damit in den schmalen Bereich zwischen den Nukleotiden 2530 und 2860 zu liegen (vgl. Genkarte im Abschnitt 5.1.2., Fig. 5.3.)

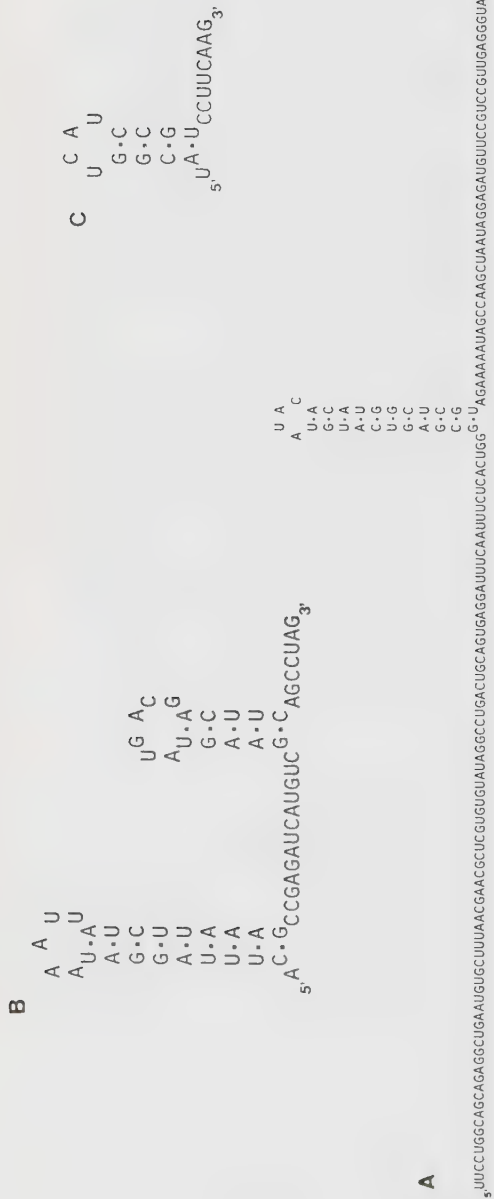


Fig. 4.10. Nukleotid-Sequenzen und mögliche Sekundärstrukturen von Fragmenten der M-Serie
Zur Sequenzbestimmung siehe Legende zu Fig. 4.8., sowie Meyer & al. (1979). Freie Energien (ΔG) für Sekundärstruk-
tur-Elemente nach Tinoco & al. (1973).

A. Fragment M-2b.

Dem Fragment M-2a fehlen 9 Nukleotide am 3'-Ende. Der Grund für die höhere Mobilität von M-2b im nicht-denaturie-
renden Polyacrylamid-Gel ist unbekannt, $\Delta G = -9.6$ kcal (Schleife).

B. Fragment M-5

$\Delta G = -4.4$ kcal (grosse Schleife) und -2.8 kcal (kleine Schleife).

C. Fragment M-11

$\Delta G = -5.4$ kcal (Schleife).

4.5.3.2.5. Bindung der isolierten Fragmente M-2 und S-3 an Replikase

In bezug auf die Rolle der S- und M-Bindungsstellen bei der Wechselwirkung zwischen Q β RNA und Replikase war die Frage von Interesse, ob die isolierten S- und M-Fragmente ihre im Vergleich zu anderen RNA-Abschnitten erhöhte Affinität zu Replikase beibehalten oder ob für die spezifische Bindung dieser Segmente die räumliche Gesamtstruktur der Q β RNA Voraussetzung ist. Aus diesem Grund wurden präparative Mengen (2-5 μ g) der 32 P-markierten Fragmente M-2 (a+b) und S-3 isoliert und die Selektivität ihrer Bindung an Replikase in einer Reihe von Kompetitionstests untersucht (Meyer & al., 1976; Meyer, 1978; Meyer & al., 1979). Zum Vergleich wurden durch Alkali-Fragmentierung aus [32 P] Q β RNA erhaltene RNA-Bruchstücke von ca. 170 bzw. 100 N Länge (isoliert auf PAA-Gelen) verwendet, und die Kompetition der [32 P] Fragmente erfolgte mit einem Gemisch von gleich langen Fragmenten, welche ebenfalls durch Alkali-Abbau aus nichtradioaktiver Q β RNA hergestellt wurden.

Fig. 4.11. ist eine Darstellung der durch Replikase (auf Millipore) gebundenen Menge [32 P] Fragment, in Funktion steigender Mengen kompetierender, nichtmarkierter Q β RNA-Fragmente. Sie zeigt, dass die Bindung von Fragment S-3 in S-Puffer vom Fragment-Gemisch überhaupt nicht, diejenige von M-2 in M-Puffer nur wenig konkurrenziert wird, während die Bindung des [32 P] Fragmentgemischs unter beiden Bedingungen praktisch vollständig auf Kompetition empfindlich ist (siehe auch Weber & al., 1972).

Eine weitere Bestätigung des spezifischen Charakters der S- und M-Stellen-Interaktion ergab sich durch den Befund, dass die Fragmente S-3 und M-2 spezifische Inhibitoren der Q β Replikation in vitro darstellen (Meyer & al., 1976; Meyer, 1978; Meyer & al., 1979). Fig. 4.12. zeigt den Einfluss steigender Mengen von unmarkiertem Fragment S-3, M-2 und anderen Polynukleotiden auf die Anfangsgeschwindigkeit der Initiation mit Q β RNA als Matrize (in Gegenwart von HF und GTP/ATP). Die Fragmente S-3 und M-2 sind annäherndso gute Inhibitoren wie Poly U und Poly C (Kettenlänge ca. 100-170 N), während statistische Q β Frag-

Fig. 4.11. Bindung der Fragmente M-2 und S-3 an Replikase in Gegenwart kompetierender Q β RNA-Fragmente von statistischer Zusammensetzung

A. Bindung von [32 P] M-2a/b unter M-Bedingungen in Gegenwart zunehmender Mengen von nicht-radioaktiven, statistischen Q β RNA-Fragmenten der gleichen Länge. Die Reaktionsmischungen (7 μ l) enthielten: 10 mM Tris $\cdot$ HCl, pH 7.5, 10 mM MgCl $_2$, 2 mM DTT, 0.2 mg/ml Serum Albumin, 1.4 μ g/ml (26 pmol/ml) [32 P] M-2a/b oder [32 P] Q β RNA-Fragmente gleicher Länge von statistischer Zusammensetzung, 36 μ g/ml (167 pmol/ml) Replikase, unmarkierte, statistische Q β RNA-Fragmente der gleichen Länge im Ueberschuss wie angegeben. Nach 10 min Inkubation bei 37 $^{\circ}$ wurden die Mischungen mit 0.2 ml Puffer verdünnt und auf Millipore-Filter abfiltriert. Die Filter wurden gewaschen (3x1 ml Puffer), getrocknet und die gebundene Radioaktivität wurde im Scintillationszähler bestimmt. Spezifische Radioaktivität der [32 P] RNA 5 $\cdot$ 10 5 cpm/ μ g. Der 100 %-Wert entspricht 0.06 pmol Fragment pro pmol Enzym.

■- Bindung von [32 P] M-2a/b. ●- Bindung von statistischen [32 P] Q β RNA-Fragmenten.

B. Bindung von [32 P] S-3 unter S-Bedingungen in Gegenwart zunehmender Mengen von nicht-radioaktiven, statistischen Q β RNA-Fragmenten der gleichen Länge.

Vorgehen wie unter A, aber 10 mM MgCl $_2$ im Puffer wurde durch 0.15 M NaCl ersetzt. Der 100 %-Wert entspricht 0.08 pmol Fragment pro pmol Enzym.

■- Bindung von [32 P] S-3. ○- Bindung von statistischen [32 P] Q β RNA-Fragmenten gleicher Länge.

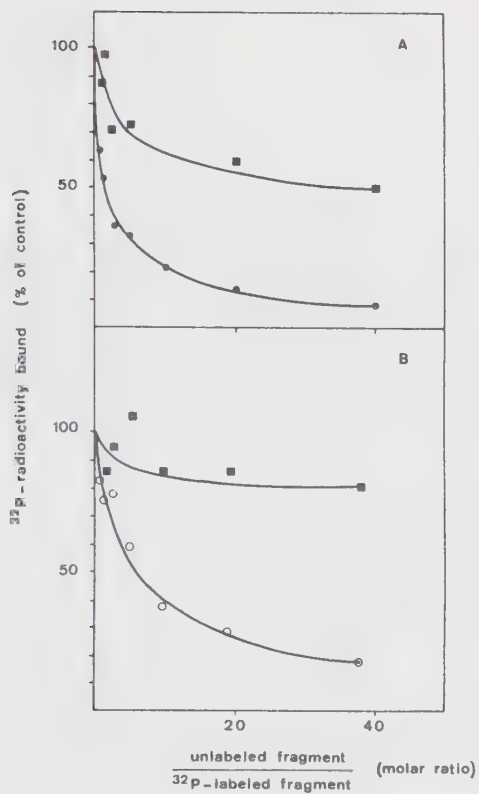


Fig. 4.11.

Fig. 4.12. Einfluss der Fragmente M-2a/b, S-3 und anderer Polynukleotide auf die Initiationsgeschwindigkeit von Replikase

Das Prinzip der Messung besteht darin, dass nach einer Vorinkubation mit dem Inhibitor-Fragment die Initiation (mit HF, GTP und ATP) auf eine sehr kurze Periode (20 sec) beschränkt wird. In der anschliessenden Elongationsperiode werden die angefangenen Ketten in Gegenwart von PES und allen 4 Triphosphaten zu Ende synthetisiert. Unter diesen Bedingungen ist der total gemessene Einbau von markiertem Triphosphat proportional zur Anzahl initiiertter Ketten.

Reaktionsgemische (14 μ l) mit 80 mM Tris $\cdot$ HCl, pH 7.5, 12 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, Q β Replikase (1 Einh.) und zunehmenden Mengen (0.02-0.2 μ g) nichtmarkierter Fragmente M-2a/b, S-3 oder anderer Polynukleotide wurden 3 min bei 37 $^{\circ}$ vorinkubiert. Initiation der RNA-Synthese erfolgte durch Zugabe einer Lösung (10 μ l) des obigen Puffers mit 1 mM GTP, 0.16 mM [32 P] ATP (spez. Rad. $3 \cdot 10^5$ cpm/nmol), 1 Einh. Wirtsfaktor HF und 0.8 μ g Q β RNA, praeinkubiert für 2 min bei 37 $^{\circ}$. Nach 20 sec bei 37 $^{\circ}$ wurde die weitere Initiation abgestoppt und die Elongation eingeleitet durch Zugabe einer Lösung (1 μ l) von 2.5 mM CTP und UTP sowie 1.25 mg/ml PES. Nach weiteren 5 min bei 37 $^{\circ}$ wurden die Reaktionsgemische mit Trichloressigsäure behandelt und die säureunlösliche Radioaktivität auf Filtern im Scintillationszähler bestimmt. In Abwesenheit von RNA-Fragmenten betrug die eingebaute Menge [32 P] ATP 30 pmol (100 %-Wert). Die ohne Zugabe von Q β RNA (Matrize) gemessene Radioaktivität betrug 1.9 % und wurde von allen Werten abgezogen.

A. Einfluss des Fragments M-2a/b (■), von statistischen Q β RNA-Fragmenten (▲) und von statistischen E.coli rRNA-Fragmenten (●) der gleichen Grösse.

B. Einfluss des Fragments S-3 (□), von statistischen Q β RNA-Fragmenten (△) und von statistischen E.coli rRNA-Fragmenten (○) der gleichen Grösse.

C. Einfluss von Poly U (⊗) und Poly C (⊙), beide mit einer ungefähren Kettenlänge von 130 Nukleotiden.

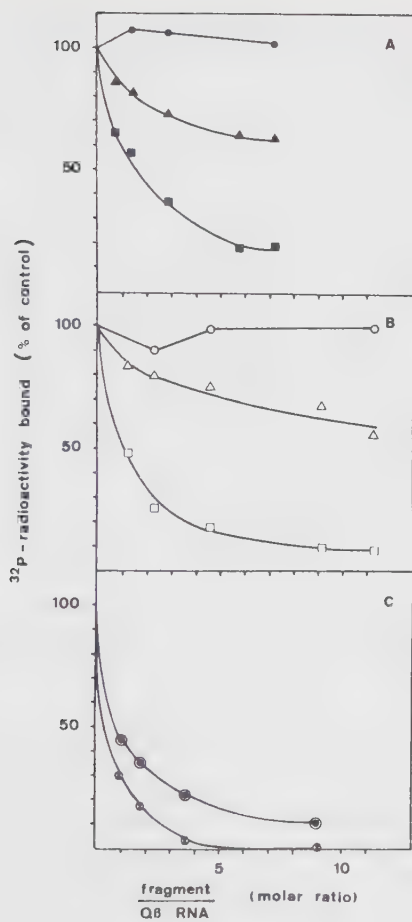


Fig. 4.12.

mente von 100 N. bzw. 170 N. Länge nur wenig und ribosomale RNA-Fragmente der gleichen Grössen überhaupt keine Inhibition verursachen.

Interessant ist ausserdem, dass die Poly C-abhängige Poly G-Synthese der Inhibition durch die Fragmente M-2 und S-3 nicht unterworfen ist, wohl aber derjenigen durch Poly U (Tab. 4.2.). Dieses letztere Ergebnis lässt sich zwanglos so interpretieren, dass die Fragment-Inhibition (im Unterschied zur Poly U-Inhibition) nicht an der katalytischen Stelle der Replikase erfolgt, sondern anderswo: höchstwahrscheinlich durch Konkurrenz an der normalerweise mit der S-bzw. der M-Region der RNA in Wechselwirkung tretenden Stelle.

Auf den ersten Blick scheint die Inhibitionswirkung des S-3 Fragments in einem gewissen Widerspruch zu stehen zu der oben geäusserten Behauptung, die S-Bindungsstelle sei nicht essentiell für die Matrizerkennung durch Replikase. Diese Situation lässt sich auf verschiedene Arten interpretieren, je nachdem ob Replikase für die Interaktion mit der M- und S-Region eine einzige Bindungsstelle oder aber zwei verschiedene, einander eventuell beeinflussende Bindungsstellen aufweist. Eine schematische Darstellung der verschiedenen denkbaren Bindungsmodelle ist in Fig. 4.13. wiedergegeben. Im Hinblick auf diese Frage wurden Versuche ausgeführt, in welchen die Bindung von radioaktivem Fragment M-2 der Konkurrenz durch nichtmarkiertes Fragment S-3 unterworfen wurde und umgekehrt (Meyer, 1978; Meyer & al., 1979). Dabei zeigte es sich, dass tatsächlich eine wirksame Konkurrenz beobachtet werden kann (Fig. 4.14.). Ein damit übereinstimmender Befund wurde durch eine etwas abgeänderte Versuchsanordnung erhalten, bei welcher beide Fragmente dem Enzym in radioaktiver Form zur Bindung angeboten wurden. In Gegenwart sättigender Mengen des einen Fragments war es nämlich nicht möglich, durch Zugabe des anderen Fragments zusätzliche Radioaktivität an das Enzym zu binden. Infolge der schon mehrfach erwähnten Heterogenität der Replikase konnte auch hier die Stöchiometrie der Bindungsreaktion nicht bestimmt werden. Die Ergebnisse lassen also die Frage, ob auf der Replikase eine oder zwei Bindungsstellen für interne RNA-Sequenzen existieren, noch offen; ausgeschlossen scheint bisher

Fragment	Molares Verhältnis Fragment/Poly C	[³ H] GMP-Einbau pmol	%
Keines	-	28.1	100
M-2a/b	2.5	24.1	86
	5	25.1	89
S-3	4	21.6	77
	8	20.6	73
stat. Q β (170 N.)	2.5	22.1	79
	5	24.6	88
stat. Q β (100 N.)	4	35.6	127
	8	21.6	75
stat. rRNA (170 N.)	2.5	22.6	80
	5	22.1	79
stat. rRNA (100 N.)	4	24.6	88
	8	20.1	72
Poly U	3	0	0
	6	0	0

Tabelle 4.2. Einfluss der Fragmente M-2a/b, S-3 und anderer Polynukleotide auf die Poly C-abhängige Poly G-Synthese durch Q β Replikase

Reaktionsmischungen (15 μ l) mit 80 mM Tris-HCl, pH 7.5, 12 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 0.5 Einh. Replikase und RNA-Fragmenten nach Angabe wurden 3 min bei 37° vorinkubiert. Die Poly G-Synthese wurde eingeleitet durch Zugabe einer Lösung (10 μ l) des obigen Puffers mit 0.3 mg/ml Poly C (MG 10⁵) und 0.7 mM [³H] GTP (spez. Rad. 6.4·10⁵ cpm/nmol), praeinkubiert für 2 min bei 37°. Nach 2 min Inkubation bei 37° wurde die säureunlösliche Radioaktivität bestimmt. Die in Abwesenheit von Replikase gemessene Radioaktivität (0.4 pmol) wurde von allen Werten abgezogen. Abkürzungen: stat. Q β : Q β RNA-Fragmente von statistischer Zusammensetzung und einer mittleren Länge von 170 bzw. 100 Nukleotiden. stat. rRNA: E.coli ribosomale RNA-Fragmente von statistischer Zusammensetzung und einer mittleren Länge von 170 bzw. 100 Nukleotiden.

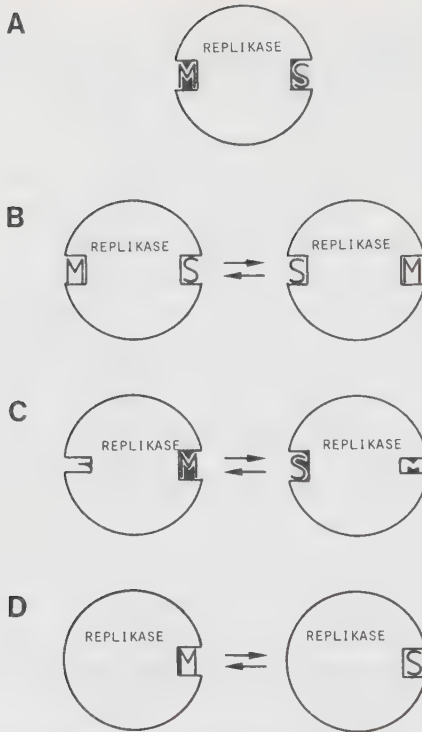


Fig. 4.13. Modelle für die Bindung der M- und S-Stelle durch Q β Replikase

A. Replikase hat je eine spezifische Bindungsstelle für die M- und für die S-Region der RNA. Sofern vom Bindungsverhalten der M- und S-Fragmente auf die Bindung der intakten Q β RNA geschlossen werden kann, erscheint dieses Modell aufgrund der Ergebnisse von Wettbewerbsversuchen (Fig. 4.14.) ausgeschlossen.

B. Zwei Bindungsstellen pro Enzym, welche nicht zwischen der M- und der S-Region (zumindest nicht zwischen Fragment M-2 und S-3) unterscheiden können.

C. Je eine spezifische Bindungsstelle für M bzw. S, wobei aber nur eine der beiden Stellen auf Mal besetzt sein darf (Allosterie).

D. Eine einzige Bindungsstelle pro Enzym, welche sowohl M wie S binden kann.

Die Modelle B und D haben den Nachteil, dass an der Sequenz von S-3 und M-2 nichts Gemeinsames erkennbar ist, was der hohen Affinität von Replikase für gerade diese beiden Fragmente zugrunde liegen könnte. Modell B würde sogar 2 Stellen mit dieser gleichen partiellen Selektivität postulieren, was noch unwahrscheinlicher erscheint.

lediglich ein Bindungsmodell (Fig. 4.13.A), welches für die M- und für die S-Sequenz je eine spezifische und unabhängig von der andern wirksame Bindungsstelle vorsieht. In Betracht fallen nach wie vor: Modell B mit 2 Bindungsstellen per Enzym, welche aber nicht zwischen M und S unterscheiden können (zumindest nicht in ihrer hier vorliegenden Fragment-Form); Modell C, d.h. 2 Bindungsstellen mit Spezifität für M bzw. S, welche aber nicht unabhängig voneinander wirksam sind, sondern einander negativ beeinflussen, so dass pro Molekül immer nur eine der beiden Sequenzen gebunden werden kann (Allosterie); schliesslich Modell D mit einer einzigen Bindungsstelle, in welche entweder M oder S Sequenzen, nie aber beide gebunden werden können.

Es erscheint als recht befriedigend, dass es gerade die nicht ausgeschlossenen Möglichkeiten B-D sind, welche sich auch mit dem Inhibitionsverhalten der M- und S-Fragmente zwanglos vereinbaren lassen. Im weiteren scheinen die Modelle C und D den Vorzug zu verdienen, und zwar vor allem deshalb, weil sie mit der schon früher geweckten Vorstellung im Einklang stehen, dass der Replikase-Q β RNA-Komplex in zwei Gleichgewichtszuständen vorliegen kann, nämlich einem S-Zustand, der durch einwertige Metallionen, sowie einen M-Zustand, der durch Magnesiumionen stabilisiert wird. Ob diesen Zuständen unterschiedliche Konformationen des Proteins oder der RNA zugrunde liegen, lässt sich allerdings noch nicht beurteilen.

4.5.3.2.6. Zur Bindung des 3'-Endes von Q β RNA

Weder im S- noch im M-Bandenmuster sind prominente Komponenten vom 3'-Ende der Q β RNA zu finden. Ohne jeden Zweifel muss aber bei der Initiation ein Kontakt zwischen der katalytischen Stelle von Replikase und dem 3'-Ende zustandekommen. Man würde also erwarten, dass Q β RNA-Replikase-Komplexe nach erfolgter Initiation in Gegenwart von HF, GTP und ATP bei der RNase-T $_1$ Verdauung ein RNA-Fragment vom 3'-Ende binden sollten. Tatsächlich zeigten aber die aus solchen Versuchen erhaltenen Fragmentmuster nie irgendwelche neuen Banden, welche vom 3'-Ende hätten herrühren können, sondern vorwiegend die Fragmente der M-Serie sowie etwas S-3 (der für die Initiation verwendete "I-Puffer" enthält

Fig. 4.14. Bindung der [32 P]-markierten Fragmente M-2a/b und S-3 in Gegenwart der unmarkierten Fragmente S-3 bzw. M-2a/b und anderer Polynukleotide.

Die Reaktionsmischungen (10 μ l) enthielten: 80 mM Tris $\cdot$ HCl, pH 7.5, 12 mM MgCl $_2$, 1 mM EDTA, 2 mM DTT, 0.2 mg/ml Serum Albumin, 2 μ g/ml [32 P] Fragment, 22.5 μ g/ml (100 pmol/ml) Q β Replikase, 10 μ g/ml Hefe-Träger-RNA (zur Herabsetzung unspezifischer Bindung) und zunehmende Mengen nichtmarkiertes Fragment nach Angabe. Inkubation und Messung der gebundenen Radioaktivität wie in der Legende zu Fig. 4.10., ausser dass die Filter zwecks Herabsetzung der unspezifischen Bindung mit 0.5 mg/ml Hefe-Träger-RNA vorbehandelt wurden. In Vorversuchen war bestimmt worden, dass das verwendete Verhältnis von [32 P] Fragment und Replikase zur Sättigung des Enzyms ausreicht.

A. [32 P] M-2a/b (38 pmol/ml, spez. Rad. $6.6 \cdot 10^4$ cpm/pmol).
100 % = 0.02 pmol Fragment pro pmol Replikase.

B. [32 P] S-3 (60 pmol/ml, spez. Rad. $2 \cdot 10^4$ cpm/pmol).
100 % = 0.1 pmol Fragment pro pmol Replikase.

Als Kompetitoren wurden folgende unmarkierten RNA-Fragmente eingesetzt: M-2a/b (■—■), S-3 (▲—▲), statistische Q β RNA-Fragmente von 170 N. (●—●) bzw. 100 N. (○—○), E.coli ribosomale RNA-Fragmente von 170 N. (●---●) bzw. 100 N. (○---○), Poly U (x--x) und Poly C (x—x) von ca. 130 N. Länge.

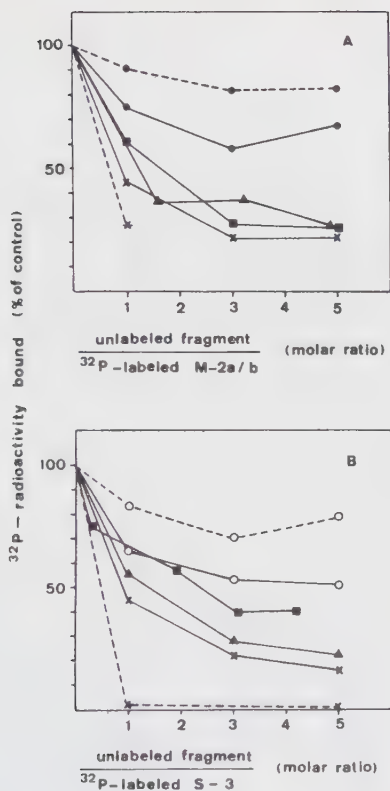


Fig. 4.14.

Fig. 4.15. Autoradiogramme der zweidimensionalen Gel-Elektrophorese von RNase T₁-Oligonukleotiden aus [³²P] Q β RNA bzw. Replikase-gebundenen [³²P]Q β RNA-Fragmenten

A. Gemisch aller RNase T₁-Oligonukleotide aus [³²P] Q β RNA.

[³²P] Q β RNA (1 μ g) und Hefe-Träger-RNA (20 μ g) in 20 mM Tris⁺HCl, pH 7.5, 2 mM EDTA (8 μ l) wurden während 30 min bei 37° mit 10 Einh. RNase T₁ verdaut.

B. RNase T₁-Oligonukleotide aus den unter S-Bedingungen an Replikase gebundenen [³²P] Q β RNA-Fragmenten.

C. RNase T₁-Oligonukleotide aus den unter M-Bedingungen an Replikase gebundenen [³²P] Q β RNA-Fragmenten.

D. RNase T₁-Oligonukleotide aus den unter I-Bedingungen in Gegenwart von Wirtsfaktor HF und GTP an Replikase gebundenen [³²P] Q β RNA-Fragmenten. Die Konzentration von HF war 100 Einh./ml und von GTP 0.4 mM.

Die Herstellung der Bindungsfragmente erfolgte nach dem in der Legende zu Fig. 4.6. und Tabelle 4.1. beschriebenen Verfahren. Eingesetzt wurden je 9.2 μ g [³²P] Q β RNA und 4.5 μ g Replikase in 0.1 ml Reaktionsvolumen. Die Bindungsfragmente wurden mit RNase T₁ verdaut wie unter A. Die zweidimensionale Polyacrylamidgel-Elektrophorese wurde nach dem Verfahren von Billeter (1978) ausgeführt. Die spez. Radioaktivität der [³²P] Q β RNA betrug überall 3.8 $\cdot$ 10⁶ cpm/ μ g.

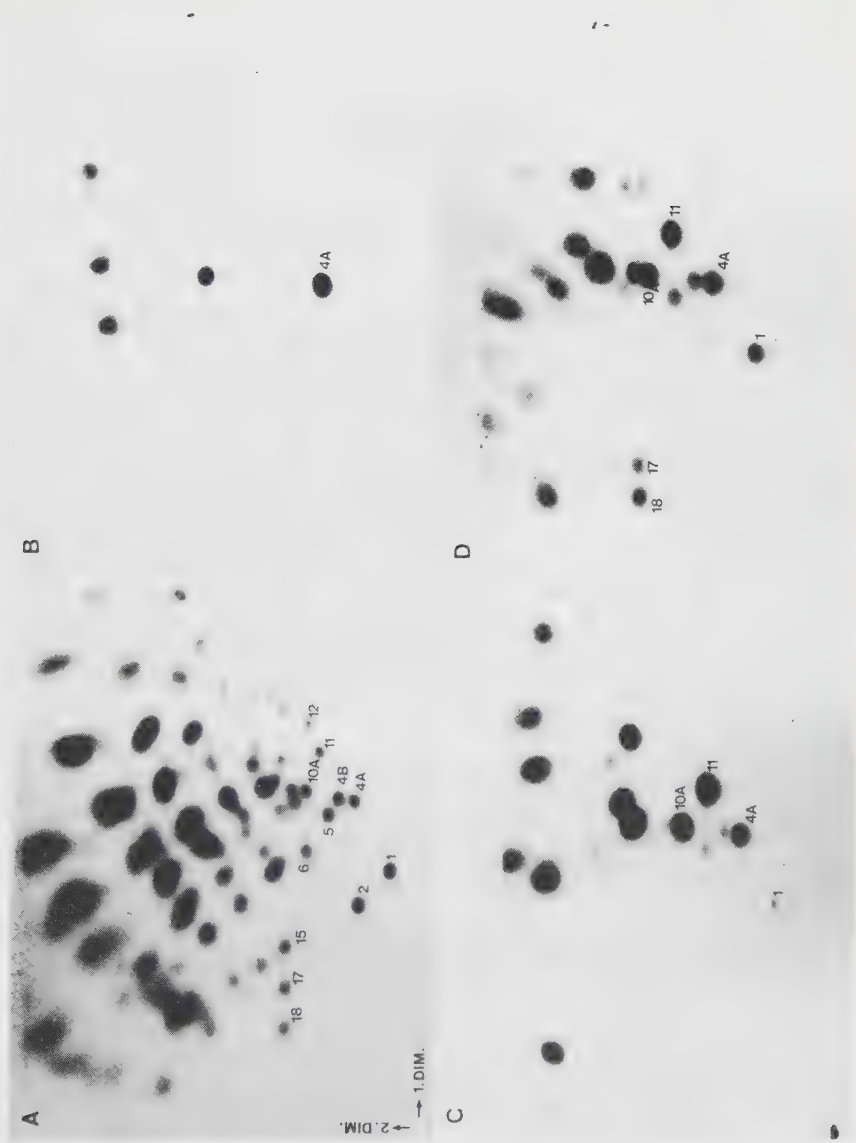


Fig. 4.15.

Fig. 4.16. Quantitative Auswertung der zweidimensionalen Gel-Elektrophorese von RNase T₁-Oligonukleotiden aus Replikase gebundenen Q β RNA-Fragmenten

Die Histogramme zeigen die relative molare Ausbeute (in cpm/Nukleotid) der RNase T₁-Oligonukleotide, in einer Anordnung entsprechend ihrer ungefähren Position auf der Genkarte.

A. S-Bedingungen. Auswertung des in Fig. 4.15. B gezeigten Experiments.

B. M-Bedingungen. Auswertung des in Fig. 4.15. C gezeigten Experiments.

C. I-Bedingungen. Wie in Fig. 4.15. D, aber ohne GTP und HF.

D. I-Bedingungen. Wie in Fig. 4.15. D, aber ohne GTP.

E. I-Bedingungen. Auswertung des in Fig. 4.15. D gezeigten Experiments.

F. Einfluss von PES auf den Initiationskomplex: Das Vorinkubationsgemisch (40 μ l) enthielt 80 mM Tris-HCl, pH 7.5, 12 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 2 mM DTT, 0.2 mg/ml Serum Albumin, 2.2 μ g Replikase und (in einem der zwei Ansätze) 120 μ g/ml PES. Nach 3 min bei 37° wurde eine Lösung desselben Puffers (10 μ l) mit 5.2 μ g [³²P] Q β RNA (spez. Rad. $2.5 \cdot 10^6$ cpm/ μ g), 5 Einh. HF und 4.8 mM GTP zugegeben. Nach einer Initiationsperiode von 20 sec bei 37° wurde mit demselben Puffer auf das 5-fache Volumen verdünnt unter Zugabe von 26 μ g unmarkierter Q β RNA und RNase T₁ (1 Einh./ μ g RNA). Die Verdauung erfolgte während 10 min bei 25°, dann wurde die Mischung auf Millipore abfiltriert. Isolierung der Bindungsfragmente, RNase T₁-Verdauung und zweidimensionale Auftrennung wie in der Legende zu Fig. 4.15. Schwarze Blocks: Vorinkubation in Gegenwart von PES. Weisse Blocks: Vorinkubation ohne PES.

G. Bindung in Gegenwart von Mangan-Ionen: 46 μ g [³²P] Q β RNA (spez. Rad. $3.5 \cdot 10^6$ cpm/ μ g) und 22.5 μ g Replikase wurden inkubiert in 0.5 ml 80 mM Tris-HCl, pH 7.5, 8 mM MnCl₂, 2 mM DTT und 0.2 mg/ml Serum Albumin. Nach 8 min bei 37° erfolgte eine 5-fache Verdünnung mit dem gleichen Puffer (ohne DTT und Albumin) unter Zugabe von 250 μ g unmarkierter Q β RNA und 300 Einh. RNase T₁. Die Verdauung dauerte 10 min bei 25°. Alles weitere wie bei F.

H. Initiation in Gegenwart von Mangan-Ionen: Ansatz identisch mit G, ausser dass die Komplexbildung in Gegenwart von 0.4 mM GTP erfolgte.

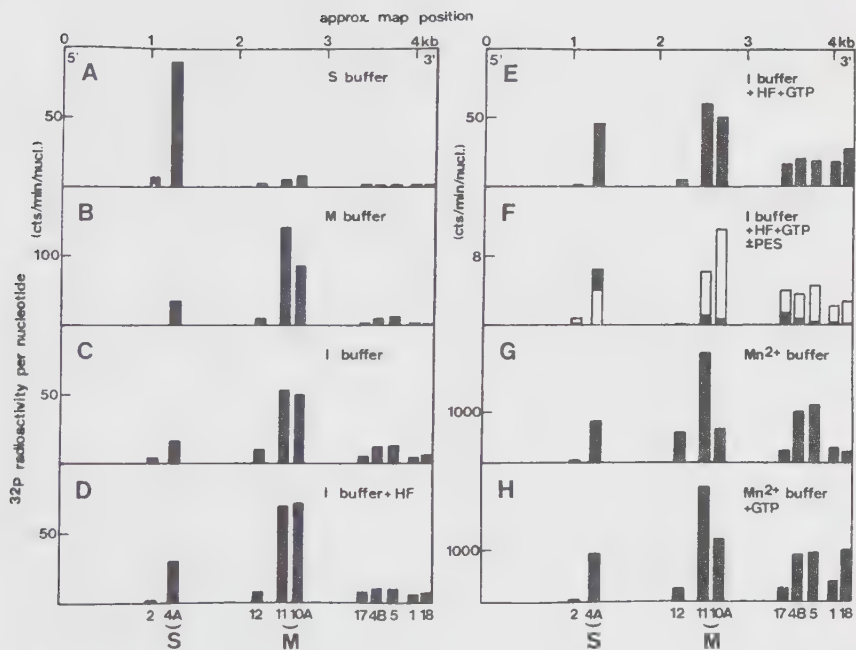


Fig. 4.16.

80 mM Tris HCl und 12 mM $MgCl_2$ und hat somit eine etwas höhere Ionenstärke als normaler M-Puffer). Ausserdem wurde gelegentlich auch eine kleine Menge des von HF gebundenen Oligonukleotids T-17 festgestellt.

Ein empfindlicherer Nachweis für vom 3'-Ende stammende, gebundene RNA-Fragmente gelang dadurch, dass das gesamte von einem Filter isolierte Material anstelle der eindimensionalen Gel-Elektrophorese, zuerst einer vollständigen Verdauung mit RNAse T_1 und dann einer zweidimensionalen Gel-Elektrophorese unterworfen wurde (Meyer, 1978; Meyer & al., 1978; Meyer & al., 1979). Da dieses Trennsystem eine grosse Anzahl charakteristischer T_1 -Oligonukleotide von Q β auflöst (M. Billeter, 1978), lassen sich alle in der Fragmentmischung repräsentierten Regionen des Q β Genoms leicht qualitativ und quantitativ erfassen (Fig. 4.15.A), insbesondere auch das 3'-Ende, welches durch 2 bereits erwähnte, typische T_1 -Oligonukleotide vertreten ist, nämlich das terminale Oligonukleotid T-18 (14 N.) sowie Oligonukleotid T-1 (26 N.).

Dabei stellte sich heraus, dass Bindungskomplexe vom S-, M- und I-Typ zwar die erwarteten T_1 -Oligonukleotide der S- und M-Stellen (T-4a bzw. T-10a/T-11) in guter Ausbeute ergaben, aber wiederum nur sehr wenig Bindung des 3'-Endes erkennen liessen (Fig. 4.15.B,C und Fig. 4.16.A,B). Erst bei in Gegenwart von HF und GTP initiierten Komplexen erschien eine gewisse Menge des 3'-terminalen Oligonukleotids (Fig. 4.15 D und 4.16.C-E). Interessante Resultate lieferte diese Versuchsanordnung auch für in Gegenwart von Manganionen (8 mM) hergestellte Komplexe: Unter diesen Bedingungen ist die Ausbeute an 3'-Ende bedeutend höher als mit Magnesium, und diese erhöht sich nochmals ca. 4-fach in Gegenwart von GTP (Fig. 4.16.G,H). Ausserdem zeigen sich auch mit Mangan die für die M- und die S-Stelle typischen Oligonukleotide, teilweise in bedeutend erhöhter Ausbeute.

Es scheint also tatsächlich, dass Replikase im Bindungskomplex unter M- oder S-Bedingungen nur eine sehr geringe Affinität zum 3'-Ende aufweist. Zur Bindung des 3'-Endes ist sowohl die Gegenwart von HF wie von GTP notwendig, so dass es zur Initiation kommen kann. Vielleicht ist es überhaupt erst die Bindung an das bei der Initiation synthetisierte

Oligonukleotid, welche das 3'-Ende der Matrize genügend fest an das Enzym fixiert, dass diese Wechselwirkung in unserer Versuchsanordnung nachgewiesen werden kann. Die Rolle des Wirtsfaktors HF könnte man sich so vorstellen, dass HF dazu dient, der katalytischen Stelle von Replikase das 3'-Ende so zu präsentieren, dass die Initiation durch GTP erleichtert wird. Trotzdem ist aber nur ein beschränkter Anteil der Komplexe zur Initiation befähigt (ca. 5-20 % je nach Enzympräparat, siehe oben), was auch durch die eher bescheidene Ausbeute an terminalem Oligonukleotid unter diesen Bedingungen bestätigt wird. In Gegenwart von Mangan steigt sowohl der Wirkungsgrad der Initiation wie auch die Ausbeute an 3'-terminalem Fragment um ein Mehrfaches: Mangan leistet also ähnliches wie HF, nur viel wirksamer - und unter Preisgabe der Matrizenspezifität.

Die Zugabe von PES ins Initiationsgemisch führte zum Verschwinden der für die M-Stelle typischen Oligonukleotide (T-10a/T-11), hingegen zum stärkeren Hervortreten des S-Stellen-Oligonukleotids T-4a (Fig. 4.16.F). Wurde PES erst nach erfolgter Initiation zugesetzt, so liess sich die gleiche Erscheinung beobachten; das terminale Oligonukleotid T-18 blieb hierbei nach wie vor gebunden. PES verhindert also nicht nur die Enzymbindung an der M-Stelle, wie schon früher (Abschnitt 4.5.3.2.2.) festgestellt wurde, sondern verstärkt gleichzeitig die Bindung an der S-Stelle, d.h. bringt den Komplex in den S-Bindungszustand. In diesem Zustand ist der Komplex nicht zur Initiation befähigt, dagegen ist offenbar nach bereits erfolgter Initiation eine Elongation noch möglich. Die Befunde befinden sich im Einklang mit der Annahme, dass die Interaktion an der M-Stelle für die Initiation der Q β -Plusstrang-gesteuerten RNA-Synthese essentiell ist.

4.5.3.2.7. Abbauversuche an Komplexen mit Teilkomponenten des Replikase-Systems

Die Rolle der verschiedenen Enzym-Untereinheiten bei der RNA-Bindungsreaktion ist noch weitgehend unklar, hingegen verfügt man über gewisse Einzelinformationen aus Bindungsversuchen mit unvollständigen Replikase-Spezies und einzelnen Untereinheiten von Replikase.

Von Interesse war insbesondere das Verhalten des früher erwähnten Enzyms ohne α -Untereinheit ($R^{-\alpha}$), von welchem bereits vermutet wurde, dass es Q β RNA weniger stark zu binden vermag (Kamen & al., 1972). Tatsächlich band $R^{-\alpha}$ unter M-Bedingungen nur etwa ein Viertel, unter S-Bedingungen sogar nur einen Zehntel soviel Q β RNA an Nitrocellulose wie eine äquivalente Menge normale Replikase. Auch die Menge der nach T_1 -Abbau der Komplexe noch an Millipore gebundenen RNA-Fragmente war bei $R^{-\alpha}$ stark herabgesetzt, nämlich auf ca. 20 % des mit dem Normalenzym erhaltenen Wertes (für M- und S-Bedingungen). Zugabe von S-1 Protein im Ueberschuss zu $R^{-\alpha}$ brachte die Bindungsfähigkeit des Enzyms sowohl vor wie nach T_1 Abbau auf eine Höhe, die annähernd derjenigen einer äquivalenten Menge normaler Replikase entspricht. Hingegen band S-1 allein unter den gewählten Bedingungen praktisch keine RNA an das Filter (R. Kamen, unveröff.); für diese Versuche wurden ausnahmsweise SS BA85 Filter anstelle der sonst üblichen Milliporefilter verwendet.

Fig. 4.17. zeigt die Bandenmuster, die durch Gel-Elektrophorese der aus den RNase T_1 -behandelten Komplexen erhaltenen Q β RNA-Fragmente mit den verschiedenen Enzym-Spezies erhalten wurden. Während Komplexe mit Replikase (und auch aus $R^{-\alpha}$ und S-1 Protein rekonstituierter Replikase) unter S- und unter M-Bedingungen die normalen S- und M-Bandenmuster ergaben, erzeugte das wenige an $R^{-\alpha}$ gebundene Material unter beiden Bedingungen nur eine unaufgelöste Grauschattierung. Dieses Resultat bedeutet offensichtlich, dass S- und M-Bindungsstellen auf Q β RNA vom α -freien Enzym nicht oder jedenfalls viel schwächer gebunden werden; das unaufgelöste Fragment-Material ist wahrscheinlich das Ergebnis unspezifischer Wechselwirkungen zwischen Protein und RNA (R. Kamen & H. Weber, unveröff.).

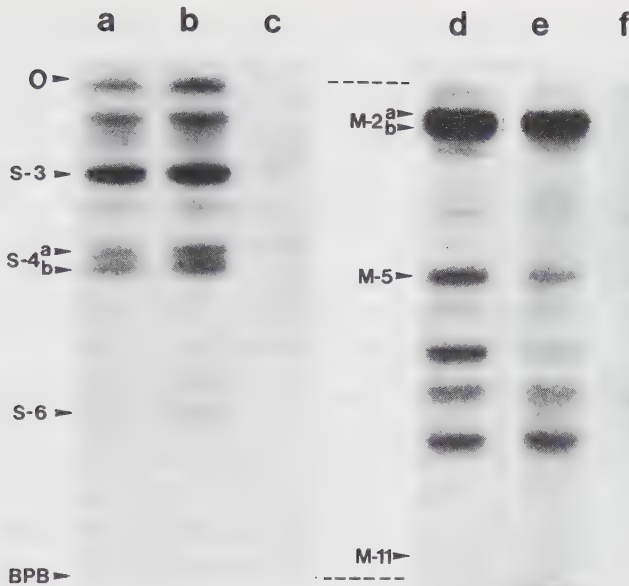


Fig. 4.17. Autoradiogramme der [^{32}P] Q β RNA-Fragmente aus Bindungskomplexen mit Replikase mit und ohne α -Untereinheit

a. Kontrollversuch: Bindungskomplex zwischen [^{32}P] Q β RNA und Replikase unter ("ursprünglichen") S-Bedingungen.

Ausführung wie in der Legende zu Fig. 4.6. A beschrieben. Es wurden 3.5 μg [^{32}P] Q β RNA (spez. Rad. $7 \cdot 10^6$ cpm/ μg) und 2.2 μg Replikase in einem Reaktionsvolumen von 100 μl eingesetzt. Der Abbau erfolgte mit 100 μg unmarkierter Q β RNA und 100 Einh. RNase T $_1$ in 1 ml 1xSSC während 2 min bei 25 $^\circ$.

b. Wie a, aber anstelle von Replikase wurde ein Gemisch von 2.8 μg R- α und 2 μg S-1 Protein eingesetzt (beide hergestellt von R. Kamen).

c. Wie a, aber anstelle von Replikase wurde 2.8 μg R- α verwendet.

d. Kontrollversuch: Bindungskomplex zwischen [^{32}P] Q β RNA und Replikase unter M-Bedingungen.

Ausführung wie in der Legende zu Fig. 4.6. D beschrieben, unter Verwendung der gleichen Mengen wie in a.

e. Wie d, aber anstelle von Replikase wurde ein Gemisch von 2.8 μg R- α und 2 μg S-1 Protein eingesetzt.

f. Wie d, aber anstelle von Replikase wurde 2.8 μg R- α verwendet.

Damit kommen wir auf das bereits einmal (Abschnitt 4.4.2.) erwähnte Problem zurück, dass paradoxerweise ein Protein der Wirtszelle, nämlich S-1, für die spezifische Erkennung der viralen RNA durch Replikase verantwortlich zu sein scheint. Leider ist vorläufig nicht bekannt, ob die Matrizenspezifität von $R^{-\alpha}$ tatsächlich geringer ist als diejenige von Replikase. Eine andere, vielleicht ebenso wahrscheinliche Lösung des Rätsels wäre, dass die Komplexe mit $R^{-\alpha}$ zwar spezifisch sind, aber zu schwach, um mittels der Filtertechnik nachgewiesen werden zu können; die Rolle der α -Untereinheit bestünde dann ausschliesslich in der Stabilisierung des Komplexes.

Sehr interessant sind in diesem Zusammenhang die Resultate von J. Steitz und Mitarb. (Senear & Steitz, 1976; Goelz & Steitz, 1977, sowie persönliche Mitteilungen von J. Steitz) bei Abbauprobeversuchen an Komplexen von S-1 mit Q β RNA. Diesen Autoren gelang es, unter leicht modifizierten Bedingungen S-1/Q β RNA-Komplexe sowie deren RNase T $_1$ Abbauprodukte an Nitrocellulosefilter (Millipore) zu binden. Die gebundenen Fragmente wurden identifiziert als zwei sehr grosse T $_1$ -Oligonukleotide, von welchen das eine (T-4a) in der S-Stelle, das andere (T-1) ganz in der Nähe des 3'-Endes lokalisiert ist. Es ist daher doch nicht ausgeschlossen, dass die α -Untereinheit im Replikase-Molekül direkt an der Bindung der S-Stelle und vielleicht auch des 3'-Endes beteiligt ist.

Ein anderer Teilkomplex des Replikase-Systems besteht aus den Untereinheiten α und β , welche durch Sedimentation bei tiefer Salzkonzentration von γ und δ abgetrennt werden können (Kamen, 1970). Solche $\alpha\beta$ Komplexe ergaben mit Q β RNA ein Bindungsverhalten und Bindungsfragmentmuster, die im wesentlichen mit denjenigen von normaler Replikase identisch waren (R. Kamen & H. Weber, unveröff.). Dieser Befund, obwohl vorläufig, deutet darauf hin, dass die Untereinheiten γ und δ wahrscheinlich an der Matrizenwechselwirkung nicht beteiligt sind.

Mit der prinzipiell immer gleichen Arbeitstechnik erzielten Senear & Steitz (1976) auch Resultate zum Bindungsverhalten des Wirtsfaktors HF.

Bei den durch HF gebundenen Q β RNA-Fragmenten handelt es sich vorwiegend um Stücke vom 3'-Ende (inklusive T-1 und T-18) sowie um ein auch von Billeter (1978) charakterisiertes Oligonukleotid aus dem Innern des Replikase-Cistrons (T-17). Mit der im letzten Abschnitt postulierten Rolle des Faktors bei der Initiation der RNA-Synthese steht offensichtlich eine Bindung am 3'-Ende von Q β RNA in bester Übereinstimmung.

4.5.3.2.8. Bindung von Oligonukleotiden aus vollständig mit T₁-RNase abgebauter Q β RNA durch Q β Replikase und ihre Komponenten

Mit Hilfe der 2-dimensionalen Gel-Elektrophorese-Technik wurde auch abzuklären versucht, ob und wie weit die Primärstruktur, d.h. die Nukleotidsequenz, den Erkennungsvorgang zwischen RNA und Protein direkt determiniert, oder ob Sekundär- und Tertiärstruktur der RNA eine alles entscheidende Rolle spielen. Vollständiger Abbau durch RNase T₁ überführt RNA in Fragmente, die noch einen Teil der ursprünglichen Sequenz-Information enthalten, jedoch praktisch jede Sekundär- und Tertiärstruktur verloren haben. Solche Abbau-Gemische wurden nun, in ³²P-markierter Form, Replikase zur Bindung angeboten (Meyer, 1978; Meyer & al., 1978; Meyer & al., 1979). Die Resultate waren recht eindrücklich, aber nicht leicht interpretierbar (Fig. 4.18.): Das Enzym zeigt auch hier eine grosse Selektivität, und zwar handelt es sich bei den gebundenen Oligonukleotiden mehrheitlich um solche, welche auch durch Abbau von Komplexen mit intakter Q β RNA schon nachgewiesen worden waren. Dominant unter allen getesteten Bedingungen waren Oligonukleotid T-1 (nahe beim 3'-Ende) sowie T-4a (in der S-Stelle), daneben aber auch in variabler Ausbeute Oligonukleotide aus M-Fragmenten (T-10a, T-11 u.a.). Gemäss Steitz und Mitarb. (Senear & Steitz, 1976; Goelz & Steitz, 1977) haben sowohl Protein S-1 (die α -Untereinheit von Replikase) wie auch HF die Eigenschaft, Oligonukleotid T-1 spezifisch zu binden, S-1 bindet ausserdem T-4a und HF bindet T-17. Offensichtlich leistet also Protein S-1 einen gewichtigen Beitrag an die Oligonukleotid-Affinität von Replikase.

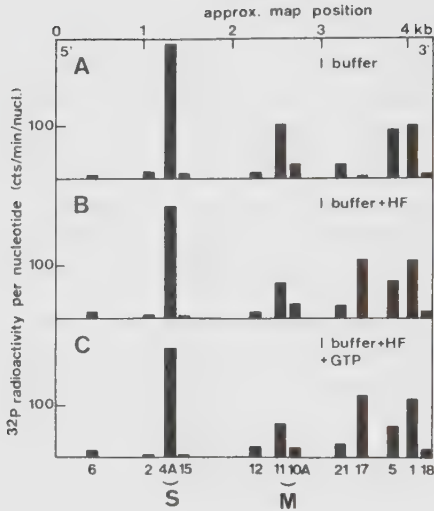


Fig. 4.18. Bindung von Replikase an das Gemisch der durch vollständigen RNase T₁-Abbau von [³²P] Q β RNA erhaltenen Oligonukleotide

Die Histogramme zeigen die relativen molaren Ausbeuten (in cpm/Nukleotid) der gebundenen Oligonukleotide, in einer Anordnung, die der ungefähren Position auf der Genkarte entspricht.

[³²P] Q β RNA (260 μ g, $1.7 \cdot 10^6$ cpm/ μ g) wurden in 25 μ l 20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 2 mM EDTA mit 160 Einh. RNase T₁ während 30 min bei 37° inkubiert. Nach Verdünnung mit Puffer wurde das Gemisch 3x mit Phenol extrahiert und die wässrige Phase nach Zugabe von NaCl und Alkohol auf -25° gekühlt. Die Fällung der RNA-Fragmente wurde abzentrifugiert, gewaschen und getrocknet.

A. 10 μ g der Fragmentmischung wurden mit 9 μ g Replikase in 50 μ l I-Puffer 5 min bei 37° inkubiert. Die Filtration erfolgte auf mit 0.5 mg/ml Hefe-Träger-RNA vorbehandelten Millipore-Filtern. Extraktion der Filter und zweidimensionale Auftrennung der Oligonukleotide wie in früheren Versuchen.

B. Wie A, aber unter Zugabe von 10 Einh. HF.

C. Wie B, aber in Gegenwart von 0.4 mM GTP.

Diese Resultate sprechen eindeutig für eine Rolle von Primärsequenzen bei der RNA-Protein-Wechselwirkung. Offen bleibt vorläufig noch, welcher Grad der Spezifität diesen Erkennungsvorgang charakterisiert, d.h. die Frage, wie genau die Sequenzen stimmen müssen, oder ob es vielleicht relativ primitive Sequenzelemente sind, die erkannt werden, wie z.B. Poly-Pyrimidin- oder Poly-A-haltige Sequenzen.

4.5.3.2.9. Bindungskomplexe mit andern RNAs

In diesem Abschnitt sind Resultate kurz zusammengefasst, welche mit Komplexen von Replikase mit einer andern als Q β Plus-Strang-RNA erhalten wurden und deren Interpretation vorläufig noch Schwierigkeiten verursacht.

Von erstrangigem Interesse ist hier natürlich das Verhalten der Q β Minusstrang-RNA, da sie neben dem Plusstrang die einzige RNA ist, die in vivo als Matrize Verwendung findet. Die Bindung von Minusstrang-RNA ist insgesamt schwächer als die von Plussträngen, ihre Matrizenaktivität wird durch Plusstränge kompetitiv inhibiert (Kondo und Weissmann, 1972 B). Da die Minusstrang-Bindung ausserdem eine starke Salzepfindlichkeit aufweist, wurden die bisherigen Versuche (W.Müller und H.Weber, unveröff.) vorwiegend unter M-Bedingungen durchgeführt.

Aus diesem zwar komplizierten, aber einigermaßen reproduzierbaren Fragmentmuster der mit RNase T₁ behandelten Replikase-Minusstrang-Komplexe wurden die sieben stärksten Banden für Sequenzbestimmungsarbeiten verwendet, wobei wiederum sowohl uniform markierte als auch durch einzelne Triphosphate markierte Minusstrang Präparate eingesetzt wurden. Die Sequenzarbeiten sind noch nicht abgeschlossen, jedoch steht ein sehr merkwürdiges Resultat bereits fest: Nicht weniger als vier der sieben untersuchten Fragmente enthielten Sequenzen, welche Bindungsstellen des Plusstrangs komplementär sind. Zwei Fragmente enthielten die gesamte dem Fragment M-5 komplementäre Sequenz plus mehrere weitere Oligonukleotide. Zwei andere Fragmente ergaben untereinander völlig identische Fingerprints und eine Sequenz, die dem Komplement von M-11 entspricht.

Der Verdacht lässt sich nur schwer unterdrücken, dass diese Ergebnisse einem Artefakt zuzuschreiben sind, der irgendwie mit der Bindung von kontaminierender Plusstrang RNA zusammenhängt. Zwar waren auch bei den Versuchen mit den reinsten Minusstrang-Präparaten (Gehalt an nichtradioaktiver Plusstrang RNA weniger als 5%) die erwähnten Banden immer deutlich vorhanden, was an sich gegen eine Beteiligung der Plusstrangfragmente bei ihrer Bindung spricht. Angesichts der relativ geringen molaren Ausbeuten dieser Fragmente im Vergleich zur eingesetzten RNA (2-4 %) lässt sich aber ein solcher Verdacht trotzdem nicht ausschliessen. Ob man nun aber den Befund als bedeutungsvoll oder als Artefakt betrachtet, in beiden Fällen dürfte es schwierig sein, einen plausiblen Mechanismus dafür anzugeben.

Eine weitere RNA-Spezies, die von Replikase als Matrize verwendet wird, und deren Bindungskomplexe durch Abbau untersucht wurden, ist die bereits mehrfach erwähnte 6 S RNA, genauer gesagt, die "Nanovariante", deren Sequenz durch W. Schaffner & al. (1977) bestimmt wurde. Das Resultat war, dass auch diese RNA (Plus- und Minusstränge) nicht am 3'-Ende, sondern an internen Stellen von Replikase gebunden wurde, obwohl es sich dabei nur um Moleküle von 90 Nukleotiden Länge handelt und die gebundenen Sequenzen überhaupt keine Homologie zu den Q β Bindungsfragmenten aufweisen. Mills & al. (1977) erzielten mit einer andern 6 S RNA Variante (Midivariant MDV-1, 221 N.) nach einem etwas verschiedenen Versuchsprinzip ähnliche Resultate.

Schliesslich sind noch Versuche zu erwähnen, welche die Abklärung der Bindung von Replikase auf MS2 RNA zum Ziel hatten, einer RNA also, welche von Replikase nicht als Matrize verwendet werden kann. Es handelt sich hier um unveröffentlichte Resultate, welche in Zusammenarbeit mit H.J. Vollenweider und W. Fiers erhalten wurden. Komplexe von Replikase mit [^{32}P] MS2 RNA wurden unter S- und M-Bedingungen mit RNase T $_1$ abgebaut. Unter S-Bedingungen wurde, neben schwächer vertretenen Banden, vorwiegend ein einziges Fragment mit hoher Ausbeute isoliert, wogegen M-Bedingungen ein sehr komplexes, schlecht aufgelöstes Bandenmuster lieferten. Die im Laboratorium von W. Fiers ausgeführte Charakterisierung des starken S-Fragments erlaubte dessen Identifikation mit einer Sequenz am Ende des MS2 Hüllprotein-Cistrons, einer Stelle also,

welche (bei R17) von Hüllprotein gebunden wird (siehe unten; Bernardi & Spahr, 1972). Die Stelle weist mit der S-Stelle von Q β keine besondere Ähnlichkeit auf, wenn man davon absieht, dass es sich in beiden Fällen um Sekundärstruktur-Schleifen mit 9 Basenpaaren (teilweise unterbrochen) handelt, welche in der ungepaarten Schleifenregion die Sequenz UAA enthalten. Wahrscheinlich handelt es sich um eine besonders leicht zugängliche Stelle am MS2 Molekül. Da Q β Replikase die Proteinsynthese an R17 RNA, im Gegensatz zur Reaktion auf Q β RNA, praktisch nicht hemmt (Kolakofsky & Weissmann, 1971A), bestand kein besonderer Grund anzunehmen, das Enzym würde auch MS2 RNA am Anfang des Hüllprotein-Cistrons binden (R17 und MS2 sind ja sehr nahe verwandt). Andererseits scheint auch Protein S-1 keine besondere Affinität für irgendeine spezifische Stelle auf R17 zu zeigen (Senear & Steitz, 1976), so dass der erwähnte Befund der Replikasebindungsstelle auf MS2 vorläufig uninterpretierbar bleibt.

4.5.3.3. Elektronenmikroskopische Untersuchung von Bindungskomplexen

Die ausgezeichneten Resultate, welche Koller & Mitarbeiter bei der elektronenmikroskopischen Darstellung von Protein-Nukleinsäurekomplexen erzielt hatten (Vollenweider et al., 1975), legten es nahe, diese Methode auch für die Untersuchung der Q β RNA-Replikase Komplexe zu verwenden (Vollenweider et al., 1976). Das Verfahren besteht im wesentlichen darin, dass der für die Streckung der Nukleinsäuren notwendige basische monomolekulare Film nicht mit Cytochrom C (wie bei der Kleinschmidt-Methode), sondern mit einer kleinmolekularen quaternären Ammoniumbase, nämlich Benzyltrimethylammoniumchlorid (BAC) hergestellt wird. An Nukleinsäuren gebundene Proteine, welche bisher durch die dicke Cytochrom-C-Schicht verdeckt wurden, bleiben auf diese Weise freisichtbar. Damit die RNA in einer gestreckten, leicht ausmessbaren Form vorliegt, ist es notwendig, den Komplex erst in einer milden Formaldehydbehandlung zu fixieren und anschliessend die RNA bei erhöhter Temperatur und Formaldehyd-Konzentration zu denaturieren, bevor die BAC-Spreitung erfolgt. Die Bedingungen für die Herstellung der Komplexe wurden

so gewählt, dass sie denjenigen entsprechen, die für optimale Enzymaktivität gebraucht werden (80 mM Tris-HCl bzw. Triäthanolamin-HCl, pH 7.5, 12 mM $MgCl_2$, 0.8 mM ATP/CTP/UTP) wobei durch das Weglassen von GTP und HF die Initiation verhindert wurde. Repräsentative Bilder von solchen Präparaten sind in Fig. 4.19. wiedergegeben. Durch die Ausmessung von über 100 Komplexmolekülen wurden die Befunde statistisch abgesichert.

Von den im Elektronenmikroskop sichtbaren RNA-Strängen trugen etwa 60 % ein Replikasemolekül in Form eines dunklen Punktes gut sichtbar gebunden. Kein RNA-Strang wies mehr als ein gebundenes Enzymmolekül auf, und die Bindung erfolgte nie an einem Ende, sondern immer im Innern des RNA-Strangs. Etwa zwei Drittel aller Komplexe zeigten die Replikase im gleichzeitigen Kontakt mit zwei Bindungsstellen auf der RNA, wodurch diese die Form einer Schleife annahm. Die Abstände dieser Bindungsstellen vom einen Ende der RNA (nämlich demjenigen mit dem kürzeren RNA-Abschnitt) wurden an einer grösseren Anzahl Komplexe (62) ausgemessen und sind in Fig. 4.20.a in Form eines Histogramms dargestellt. Zwei ausgeprägte Häufungen von Bindungsstellen treten auf, die eine bei $29.5 \pm 2.5 \%$, die andere bei $65 \pm 3.5 \%$ von einem Ende. Der naheliegende Vergleich mit den Positionen der S- und M-Bindungsstellen ergibt eine ausgezeichnete Übereinstimmung für die S-Stelle (1250 - 1350 N. = 29.6 - 32 %) ebenso wie für die M-Stelle (2550 - 2870 N. = 60.4 - 68.0 %).

Fig. 4.20b zeigt ausserdem die Lokalisierung der Replikase in den Komplexen, welche keine Schleifen, d.h. nur eine einzige Bindungsstelle aufweisen. Die gemessene, etwas breitere Verteilung ist zwanglos vereinbar mit der Annahme, dass es sich hierbei um ein Gemisch von S- und M-Stellen-Interaktionen handelt. Erst vor kurzem gelang es V. Meyer und Th. Koller (persönliche Mitteilung), auch unter reinen S-Bedingungen hergestellte Komplexe elektronenmikroskopisch darzustellen. In Übereinstimmung mit den biochemischen Resultaten wurden hierbei ausschliesslich lineare Komplexe gefunden, bei welchen Replikase 30 % vom einen Ende, d.h. wahrscheinlich an der S-Stelle, gebunden vorlag. Dem analogen Experiment unter M-Bedingungen war bisher aus technischen Gründen kein Erfolg beschieden.

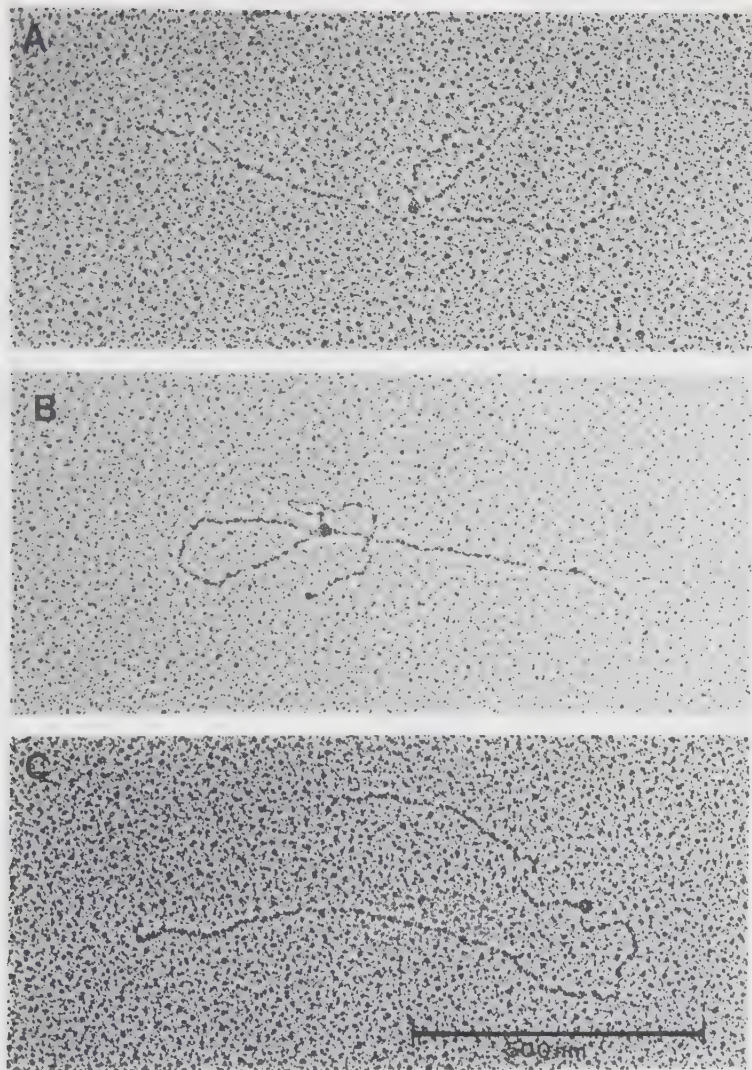


Fig. 4.19. Elektronenmikroskopische Aufnahmen von QB RNA-Replikase-Komplexen

A, B. Komplexe mit Schleifen.

C. Linearer Komplex.

Aus Vollenweider & al. (1976), wo auch die experimentellen Details beschrieben sind.

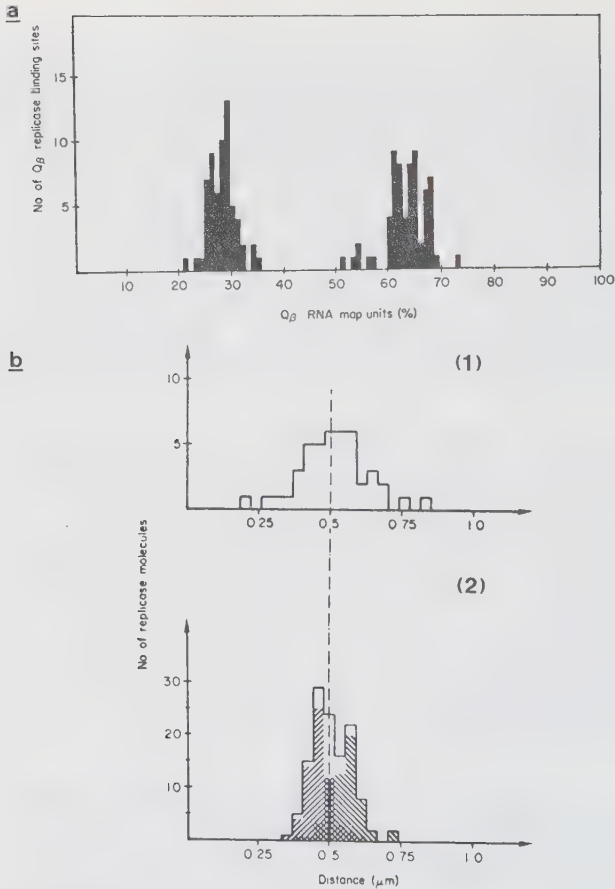


Fig. 4.20. Histogramme der Positionen von Replikase-Bindungsstellen auf Q β RNA

a. 62 elektronenmikroskopische Bilder von Q β RNA-Replikase-Komplexen mit Schleife wurden ausgemessen. Die Häufigkeit der in einem bestimmten RNA-Abschnitt (je 1 Genom-%) gefundenen Enzybindungsstellen ist gegen die Kartenposition dieses Abschnitts aufgetragen. Die Komplexe wurden so orientiert, dass sich das Ende des kürzeren freien RNA-Segments am Karten-Ursprung befindet.

b. (1) 44 lineare Komplexe wurden ausgemessen. Das Ende des kürzeren, freien RNA-Segments befindet sich am Ursprung. Länge der RNA 1.5-1.7 μ m.

(2) Zum Vergleich sind die Werte der 62 Komplexe mit Schleifen nochmals im gleichen Massstab graphisch dargestellt. Die Längen der kürzeren und der längeren freien RNA-Segmente wurden vom gleichen Nullpunkt aus aufgetragen und mit verschiedener Schraffierung eingezeichnet.

Aus Vollenweider & al. (1976).

Neben den Q β RNA-Replikase Komplexen wurden zum Vergleich auch Komplexe von E.coli RNA-Polymerase mit Q β RNA untersucht. Der Abbau solcher Komplexe mit RNase T₁ hatte ein kompliziertes, unaufgelöstes Bandenmuster ergeben, das auf eine unspezifische Wechselwirkung hindeutete. Aus den elektronenmikroskopischen Ergebnissen geht klar hervor, dass mehrere Polymerase-Moleküle auf einem RNA-Strang binden und dass die Bindung keine Spezifität für bestimmte Regionen der RNA aufweist, mit Ausnahme einer etwas erhöhten Affinität für die Enden.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die aus den biochemischen Arbeiten gezogenen Schlüsse durch die Elektronenmikroskopie weitgehend bestätigt wurden. Mit den beiden voneinander unabhängigen Methoden wurden zwei starke Bindungsstellen für Replikase im Innern der Q β RNA nachgewiesen und mit übereinstimmenden Resultaten kartiert. Keine der beiden Methoden ergab eine signifikante Interaktion am 3'-Ende der RNA im Bindungskomplex. Zusätzlich scheinen die elektronenmikroskopischen Arbeiten darauf hinzudeuten, dass nur ein Replikasemolekül auf Q β RNA eine starke Bindung eingeht und dass dieses an beiden Bindungsstellen der RNA zugleich binden kann. Eine solche Interpretation der Schleifenformen steht allerdings im Widerspruch zu den im Abschnitt 4.5.3.2.5. erwähnten Befunden, wonach die Bindung der Fragmente S-3 und M-2 kompetitiv erfolgt und eine ähnliche hemmende Wirkung auf die Initiation ausübt. Erklärungen für dieses scheinbare Paradoxon sind aber leicht vorstellbar: Z.B. ist es nicht unwahrscheinlich, dass zwar jeweils nur eine RNA-Bindungsstelle (S oder M) stark an Replikase bindet, dass sich dabei jedoch die jeweils andere Bindungsstelle in so kurzem räumlichem Abstand befindet, dass eine chemische Vernetzung mit dem Enzym durch die Formaldehydfixierung erfolgen kann. Eine zweite, nicht ausgeschlossene Möglichkeit würde darin bestehen, dass es sich bei den in den Schleifenstrukturen sichtbaren Enzym-Molekülen um Assoziate (z.B. Dimere) handelt, von welchen ein Teil die S-Stelle, ein anderer Teil die M-Stelle bindet.

4.5.4. Modellvorstellungen

Aus der grossen Menge experimentellen Materials - das allerdings noch immer Lücken aufweist - schält sich im Sinne einer zusammenfassenden Darstellung ein Interaktionsmodell heraus, das zwar im einzelnen noch teilweise unklar und nicht ganz widerspruchsfrei, in seinen grossen Zügen aber plausibel erscheint. Dieses Modell sei anhand von Fig. 4.21. kurz diskutiert.

Im Rahmen der allgemein akzeptierten Vorstellungen über den Reaktionsmechanismus von Polymerasen (Kornberg, 1969; Chamberlin, 1974) ist anzunehmen, dass die matrizen-instruierte Polymerisationsreaktion, d.h. die enzymatische Synthese von Phosphodiesterbindungen aus Nukleosid-Triphosphatvorläufern, an einer spezifischen reaktiven Stelle des Enzyms, der katalytischen Stelle erfolgt. In unmittelbarer Nachbarschaft der katalytischen Stelle ist sodann das Vorliegen einer Matrizen-Bindungsstelle anzunehmen, an welcher die Auswahl der komplementären Nukleosid-Triphosphate gemäss der Matrizensequenz vorgenommen wird (Ablese-Stelle = "decoding site"). Beide Stellen sind höchstwahrscheinlich sowohl am Initiationsschnitt wie an der Ketten-Elongation beteiligt, und es erscheint naheliegend anzunehmen, dass sie auf der β Untereinheit lokalisiert sind, obwohl eine Mitwirkung der andern Untereinheiten nicht ausgeschlossen werden kann.

Matrizenspezifität und Bindungsverhalten von Replikase lassen sich nun am einfachsten so interpretieren, dass die Affinität der Ablese-Stelle für 3'-Enden von Matrizen-RNAs inhärent schwach, die Initiation demzufolge ein wenig begünstigter Prozess ist. Diese Stelle erhebt nur geringe Spezifitätsanforderungen, nämlich dass eine Matrize nahe an ihrem 3'-Ende eine Gruppe von C-Resten aufweisen muss, damit die Initiation durch Verknüpfung von mindestens drei GTP Molekülen erfolgen kann. Infolgedessen sind Poly C, C-haltige Oligonukleotide und Heteropolymere, eine unbestimmte Anzahl verschiedener 6 S RNAs, ja auch kurze Fragmente von Q β RNA und MS 2 RNA gute Matrizen (Fig. 4.21.A), denn jede beliebige RNA zeigt wahrscheinlich Matrizenaktivität, sofern sie ausser der obgenannten noch die folgenden Bedingungen erfüllt: Erstens muss sie in genügen-

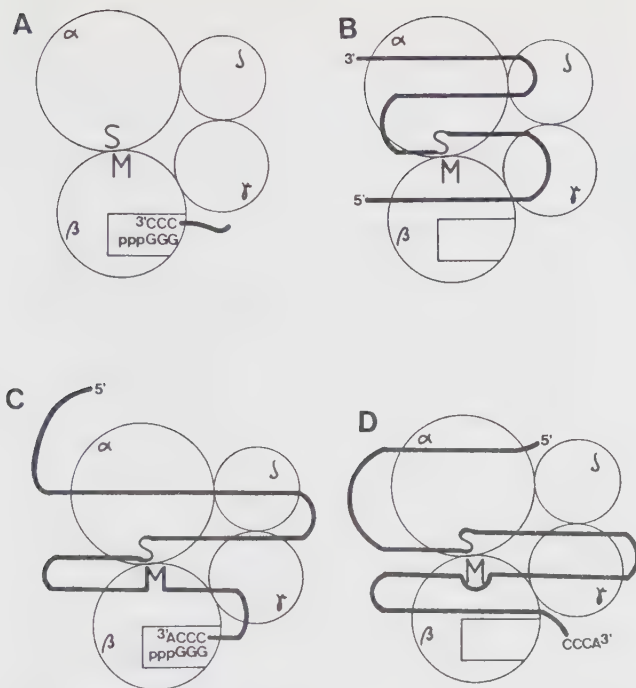


Fig. 4.21. Modellvorstellungen zur Matrizenselektivität von Q β Replikase

Die 4 Enzym-Untereinheiten sind durch Kreise dargestellt, der rechteckige Kasten in der β -Untereinheit symbolisiert die Matrizen-Ablesestelle (decoding site). Die Bindungsstellen für die S- und die M-Region sind auf der α - bzw. der β -Untereinheit in unmittelbarer Nachbarschaft zueinander eingezeichnet (nicht bewiesen, aber vgl. Abschnitt 4.5.3.2.5. und 4.5.3.3.). Matrizen- bzw. Nichtmatrizen-RNAs sind durch eine dicke, schwarze Linie dargestellt. Das Einmünden der Linie in das S- oder M-Symbol der Bindungsstellen bedeutet eine starke spezifische Bindung der RNA an dieser Stelle. Wo das Symbol von der Linie umfahren wird, soll räumliche Nähe, aber keine starke Bindung angedeutet werden.

A. Synthetische Polynukleotide als Matriz.

Viele kurze Polynukleotide mit CCC-Ende haben freien Zugang zur Ablesestelle und können bei genügender Konzentration als wirksame Matrizen dienen.

B. Hochmolekulare, heterologe RNA (z.B. MS2 RNA) wird vom Enzym gebunden (hier willkürlich an der S-Stelle), aber fast immer so, dass das 3'-Ende nicht in die Ablesestelle passt.

C. Q β Minusstrang-RNA bindet so, dass das 3'-Ende in die Ablesestelle passt und die Initiation ohne weiteres erfolgen kann (die Bindung an den S- und M-spezifischen Stellen des Enzyms ist nicht bewiesen).

D. Q β Plusstrang-RNA im Replikase-Bindungskomplex unter S-Bedingungen.

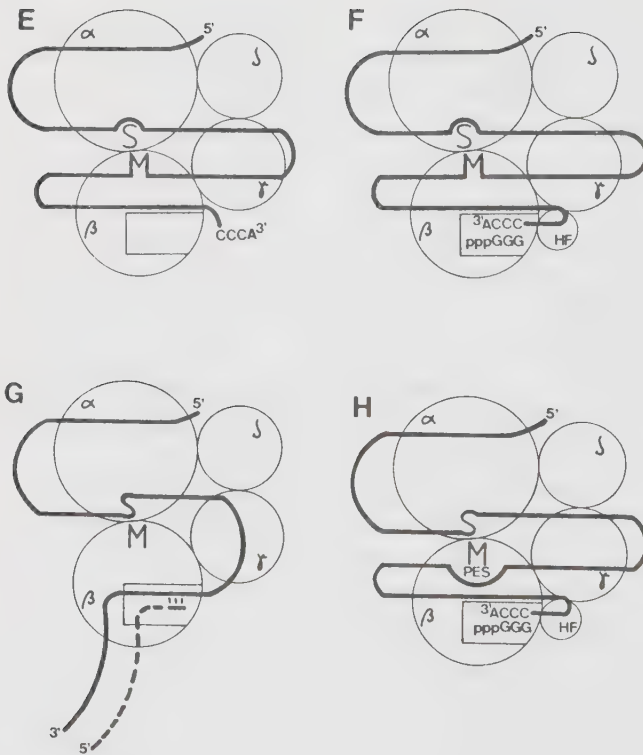


Fig. 4.21. Modellvorstellungen zur Matrizenselektivität von QB Replikase

E. QB Plusstrang-RNA im Replikase-Bindungskomplex unter M- oder I-Bindungen.

F. Initiation der RNA-Synthese an der QB Plusstrang-Matrize erfolgt erst in Gegenwart von Wirtsfaktor HF, der das 3'-Ende in eine für die Ablesestelle günstige Position bringt.

G. Hypothetisches Umschalten des Komplexes von M- auf S-Bindung während der Elongation. Unterbrochene Linie: Wachsender QB Minusstrang.

H. Erzwungenes Umschalten des Komplexes durch PES nach erfolgter Initiation.

der Konzentration vorhanden sein, um wenigstens einen signifikanten Anteil der Decodier-Stellen zu besetzen; zweitens muss sie kurz genug sein, damit sie nicht mit einer andern, stärkeren Bindungsstelle von Replikase in eine Interaktion tritt, die die gleichzeitige Bindung des 3'-Endes an der katalytischen Stelle verunmöglicht; und drittens darf sie keine ausgeprägte Sekundär- oder Tertiärstruktur aufweisen, welche die Bindung und Initiation behindern könnte (wie dies wahrscheinlich bei den tRNAs der Fall ist; Ausnahme: 6s RNA!).

Bei grösseren RNAs wie viralen oder mRNAs ist die Wahrscheinlichkeit, mit der Decodier-Stelle in eine produktive Interaktion zu treten, infolge der schwachen Affinität zum 3'-Ende und der tieferen molaren Konzentration schon an und für sich sehr gering. Zusätzlich spielt nun aber Protein S-1 (und vielleicht auch andere Untereinheiten) die Rolle eines Diskriminators, indem es seiner zellulären Funktion gemäss eine Affinität zu allen möglichen RNAs, insbesondere mRNAs aufweist und diese bindet, aber aus sterischen Gründen praktisch nie so, dass eine gleichzeitige Bindung des 3'-Endes an der Decodier-Stelle möglich ist (Fig. 4.21.B).

Im Gegensatz dazu haben sich Q β Plus- und Minusstrang-RNA sowie ihr Gen-Produkt, die Replikase- β -Untereinheit, gemeinsam so entwickelt, dass einerseits Bindungsstellen im Innern der RNA-Kette für eine starke und spezifische Bindung der RNA sorgen, und dass andererseits das 3'-Ende der Q β Matrize sich in sterisch günstiger Position zur Ablesestelle des Enzyms befindet. Plusstrang RNA weist zwei starke interne Bindungsstellen auf. Erstens die S-Stelle am Anfang des Hüllprotein-Cistrons (30 % vom 5'-Ende): Diese Interaktion erfolgt wahrscheinlich über die α -Untereinheit (S-1 Protein), sie ist nicht essentiell für die Matrizenfunktion der Q β RNA, trägt aber wahrscheinlich wesentlich zu der grossen Stabilität des Bindungskomplexes bei. Zweitens die M-Stelle kurz hinter dem Anfang des Replikase-Cistrons: Sie ist wahrscheinlich für die Bildung eines produktiven Bindungs-Komplexes verantwortlich, indem durch diese Wechselwirkung Enzym und RNA zu einer solchen

gegenseitigen Orientierung gezwungen werden, dass die katalytische Stelle am 3'-Ende initiieren kann; dies allerdings nur, sofern der Wirtsfaktor HF die Konformation der RNA in diesem Bereich auf geeignete Weise verändert (Fig. 4.21.D-F).

Ueber die Zweckmässigkeit einer solchen 3-Stellen-Wechselwirkung lässt sich a posteriori natürlich leicht spekulieren. Immerhin scheint es einleuchtend, dass die Decodier-Stelle nicht eine starke, spezifische Affinität für das 3'-Ende der Matrize aufweisen darf, denn sofort nach erfolgter Initiation muss ja diese Bindung gelöst werden, damit das Ablesen der internen Sequenzen möglich wird. Das gleiche Problem stellt sich bekanntlich auch für die RNA-Polymerase, deren starke und spezifische Bindung an die Promotor-Sequenz durch die Sigma-Untereinheit zustande kommt. Nach erfolgter Initiation wird Sigma sofort freigesetzt, wodurch das Enzym seine Affinität für spezifische Promotor-Sequenzen verliert (Chamberlin, 1974). Wenn nun die Affinität der Decodier-Stelle für die Matrizen-RNA so schwach ist, dass sie zur Gewährleistung einer genügenden Stabilität des replizierenden Komplexes nicht ausreicht, so folgt daraus, dass diese Stabilität durch interne Bindungs-Stellen gesichert werden muss. Ausserdem wird ersichtlich, dass eine einzige interne Bindungs-Stelle noch keine optimale Lösung darstellt, denn das Problem der Lösung dieser Bindung würde sich ja bei der Ablesung dieser Bindungs-Stelle erneut stellen. Der prinzipiell zweckmässigste Ausweg besteht tatsächlich in der Verwendung von zwei internen Bindungs-Stellen, so dass, wenn die Sequenz der einen Bindungs-Stelle an der "decoding site" abgelesen wird, die andere Bindungs-Stelle den Komplex zusammenhält. Das Modell postuliert also nicht eine gleichzeitige, sondern eine alternierende Bindung an den zwei internen Stellen, was genau mit den im Abschnitt 4.5.3.2.5. beschriebenen Kompetitionsversuchen und ihrer Interpretation übereinstimmt (Fig. 4.21.G). Ein solcher Wechsel der Bindungsstelle während der Elongation hat eine Parallele im Verhalten der initiierten Komplexe nach Zugabe von PES (Fig. 4.21 H, siehe auch Abschnitt 4.5.3.2.6).

Die wenigen über die Minusstrang-Bindung vorliegenden Daten sind ebenfalls mit der Vorstellung vereinbar, dass Wechselwirkungen an mehreren internen Bindungsstellen erfolgen, wobei für eine produktive Bindung

des 3'-Endes die Hilfe von HF offensichtlich nicht erforderlich ist (Fig. 4.21.C). Im ganzen ist jedoch die Bindung der Minusstrang RNA an Replikase bedeutend schwächer als die von Plusstrang RNA.

Die Frage, welches die genauen chemischen Strukturdeterminanten sind, welche zu den nicht-kovalenten Bindungsreaktionen zwischen RNA und Protein befähigt sind, bleibt weiterhin ungelöst. Bisherige Resultate weisen darauf hin, dass sowohl Primärstrukturelemente (z.B. Bindung von Oligonukleotid T-4a durch S-1 und Replikase) als auch Sekundärstrukturmerkmale (z.B. bei der Bindung von R17 Hüllprotein an R17 RNA, siehe Abschnitt 5.2.2.3.) bei Protein-RNA-Interaktionen eine Rolle spielen können. Das Prinzip der Matrizenerkennung durch Replikase liegt nun aber - gemäss dem vorgeschlagenen Modell - nicht nur in der Selektivität einer einzelnen Interaktion (welche z.B. für die S- und die M-Stelle ohne Zweifel vorhanden ist), sondern in der durch die RNA-Tertiärstruktur festgelegten räumlichen Anordnung eines ganzen Systems von Bindungsstellen, wodurch sowohl die Selektivität als auch die Bindungsstärke der passenden Matrizen-RNA um ein Vielfaches erhöht wird.

Es ist zu erwarten, dass durch Einführung von kovalenten Bindungen ("crosslinks") zwischen RNA und Protein im Bindungskomplex mittels chemischer oder photochemischer Methoden genauere Auskünfte über die an der Bindung beteiligten Strukturelemente zu erhalten wären. Insbesondere liesse sich auf diesem Wege auch bestimmen, welche Enzym-Unter-einheiten an den verschiedenen Bindungs-Interaktionen beteiligt sind. Versuche in dieser Richtung sind beabsichtigt.

5. DIE PHAGENSPEZIFISCHE PROTEINSYNTHESE UND IHRE REGULATION

5.1. Initiations- und Terminationsstellen der Cistrons

5.1.1. Isolierung der ribosomalen Bindungsstellen und Bestimmung ihrer Sequenzen

Erkennungsprozesse zwischen Makromolekülen sind nicht nur für die Replikation der Phagen RNA von Bedeutung, sie spielen auch bei der Synthese der Phagenproteine eine entscheidende Rolle. Damit eine produktive Infektion zustande kommt, muss die infizierende Phagen-RNA sofort nach ihrem Eindringen in die Zelle von Ribosomen als Messenger-RNA erkannt und so gebunden werden, dass eine korrekte Initiation der Proteinsynthese erfolgen kann.

Der Prozess lässt sich leicht *in vitro* reproduzieren: in Gegenwart von Formylmethionyl- tRNA und GTP bilden *E. coli* Ribosomen mit Q β RNA stabile Initiationskomplexe, welche sich durch Sucrosegradienten-Zentrifugation von ungebundener RNA abtrennen lassen. Es handelt sich hierbei fast ausschliesslich um "70S-Komplexe", in denen Ribosom und RNA im molaren Verhältnis 1:1 vorliegen. Durch Verwendung von Nukleasen konnten aus solchen Komplexen die vom Ribosom direkt gebundenen Stellen der RNA isoliert und der Sequenzierung zugeführt werden; es handelt sich hier, chronologisch gesehen, um die erste erfolgreiche Verwirklichung dieses Prinzips, das seither vielfache Anwendungen gefunden hat, nicht zuletzt ja auch in den im vorhergehenden Kapitel besprochenen Arbeiten. Ribosomen bieten, anders als z.B. Q β Replikase, den von ihnen gebundenen RNA-Segmenten praktisch vollständig Schutz vor Nuklease-Angriff.

Nach Verwendung von pankreatischer Ribonuklease unter relativ scharfen Bedingungen wurden deshalb aus den abgebauten Komplexen RNA-Fragmente von ziemlich einheitlicher Grösse (25 - 30 N) isoliert. Die Sequenzbestimmung solcher Ribosomenbindungs-Fragmente von Q β RNA (Hindley & Staples, 1969; Staples & al., 1971; Staples & Hindley, 1971; Steitz, 1972) und auch von anderen Phagen-RNAs (Steitz, 1969) ergab, dass

es sich hierbei stets (zumindest bei Verwendung von *E. coli* Ribosomen) um die Anfangssequenzen von Cistrons handelte: Das Initiatorcodon AUG befand sich immer ungefähr in der Mitte des geschützten Segments. Die Zuordnung der Initiationssequenzen zu den verschiedenen Cistrons erfolgte anhand der bereits bestehenden Kenntnisse über die Protein-Sequenzen: Die Hüllprotein-Sequenzen sowohl von Q β wie auch von Phagen der Gruppe I waren aufgeklärt (Königsberg & al., 1970; K. Weber, 1967), von den anderen Gen-Produkten waren wenigstens einige N-terminale Aminosäuren bekannt (Weiner & Weber, 1971; Skogerson & al., 1971). Es zeigte sich, dass nur bei Verwendung von fragmentierter Phagen-RNA die Anfänge der 3 Cistrons in ungefähr gleichem Ausmass vertreten waren. Wenn intakte RNA eingesetzt wurde, erfolgte die Ribosomenbindung überwiegend am Anfang des Hüllprotein-Cistrons. Daneben konnte etwas Material vom Anfang des Replikase-Cistrons nachgewiesen werden, während der Anfang des Maturationsprotein-Cistrons überhaupt nicht vertreten war. Offensichtlich deutet dieser Befund darauf, dass der im Gesamt-Molekül vorliegenden Sekundär- und Tertiärstruktur eine wesentliche Rolle bei der Regulation der Proteinsynthese zukommt (s. Abschnitt 5.2.2.2.).

Die Nukleotid-Sequenzen der Ribosomenbindungsstellen für die verschiedenen Cistrons von Q β - sowie von R17-RNA sind in Fig. 5.1. wiedergegeben. Alle enthalten 4-10 Nukleotide vor dem Initiator-Triplett AUG eine Anordnung von einigen Nukleotiden (4-7 N.), welche dem 3'-Ende der 16S RNA komplementär sind. Gemäss der Hypothese von Shine und Dalgarno (1974) spielt diese Komplementarität eine wichtige Rolle bei der Erkennung der Initiator-Stelle durch das Ribosom. Auffällig ist dabei, dass bei der stärksten Ribosomenbindungsstelle in intakter Q β RNA, nämlich derjenigen des Hüllprotein-Cistrons, diese Art der Komplementarität am wenigsten ausgeprägt vorliegt. Auch auf diesen Aspekt werden wir bei der Besprechung der Steuerung der Proteinsynthese noch zurückkommen.

Q β A2 PROTEIN	5' GUAU <u>AAGAGG</u> ACAU <u>AUG</u> CCUAAAAUUACCGC 3'
R17 A PROTEIN	CCUAGGAGGUUUGACCU <u>AUG</u> CGAGCUUUUAGUG
Q β HÜLLPROTEIN	UGGGUCAAUUUGAUC <u>AUG</u> GCAAAAUUAGAGAC
R17 HÜLLPROTEIN	AGAGCCUAACCGGGGUUUGAAGC <u>AUG</u> CGCUUCUAACUUU
Q β REPLIKASE	AACUAAGGAUGAAAUGC <u>AUG</u> UCUAAGACAGC
R17 REPLIKASE	AAACAUGAGGAUUACCC <u>AUG</u> UCGAAGACAACAAAG

E.coli 16S rRNA: 3'HoAUUCCUCCACUA..

Fig. 5.1. Nukleotidsequenzen der ribosomalen Bindungsstellen auf Q β und R17 RNA

Die Initiationstripletts sind eingerahmt. Kleingedruckte Basensymbole betreffen Nukleotide, die ausserhalb der vor RNase geschützten Bindungsregion liegen. Dick unterstrichene Nukleotide können mit dem 3'-Ende von E.coli 16S ribosomaler RNA basenpaaren. An Stellen, wo die 3'-terminale 16S RNA-Sequenz ein einzelnes ungepaartes Nukleotid aufweist, ist die Linie unterbrochen. Phagensequenzen aus Weissmann & al. (1973).

5.1.2. Lokalisierung der Initiations- und Terminations-Stellen der Cistrons: Die Gen-Karte des Phagen Q β

Die Charakterisierung der Ribosomenbindungsstellen war zu einer Zeit erfolgt, als die Anordnung der Cistrons auf dem Genom, d.h. die Gen-Karte des Phagen, noch nicht bekannt war. Tatsächlich lagen in dieser Hinsicht widersprüchliche Aussagen vor; bis es 1970 Weissmann und Mitarbeitern (Hindley & al., 1970) gelang, den Ort der Ribosomenbindungsstelle für das Hüllprotein-Cistron auf der Q β RNA mit genügender Genauigkeit zu bestimmen. Sie bedienten sich dabei erstmals der zu diesem Zweck entwickelten in vitro-Puls-Chase-Kartierungstechnik, die in den vorangehenden Kapiteln bereits mehrfach erwähnt und eingehend beschrieben wurde. Das Ergebnis dieses Versuchs, nämlich die Distanz von 1100-1400 Nukleotiden vom 5'-Ende bis zum Anfang des Hüllprotein-Cistrons, legte das letztere zweifelsfrei als das mittlere der drei Cistrons fest. Aufgrund der bekannten Protein-Molekulargewichte konnte nun das Replikase-Cistron (MW der β -Untereinheit: 67000 entsprechend einer RNA-Länge von ca. 1800 N.) nur noch auf der 3'-Seite des Hüllprotein-Cistrons Platz finden; das Cistron für das Maturationsprotein (MW des A2-Proteins 44000 entsprechende einer RNA-Länge von 1200 N.) stimmte dann genau mit der auf der 5'-Seite vorhandenen RNA-Länge überein.

Der Anfang des Maturationsprotein-Cistrons war bereits früher, bei der Sequenzbestimmung der ersten 150 Nukleotide vom 5'-Ende, eindeutig lokalisiert worden: Er befindet sich beim 63. Nukleotid vom 5'-Ende (Billeter & al., 1969B). Eine weitere Bestätigung für die Lokalisierung der zwei anderen Cistron-Anfänge lieferte folgendes, in Fig. 5.2. dargestelltes Experiment (Kolakofsky & al., 1973): Ribosomen wurden an intakte Q β RNA gebunden, mehrheitlich am Anfang des Hüllprotein-Cistrons. Die ribosomengebundene Plusstrang-RNA wurde nun in einer in vitro-Reaktion in Gegenwart von Q β Replikase, Wirts-Faktor und Triphosphaten (nicht-radioaktiv) als Matrize für die Synthese von Minusstrang-RNA verwendet. Auf jedem Matrizen-Molekül kam dabei die Reaktion dort zum Stillstand,

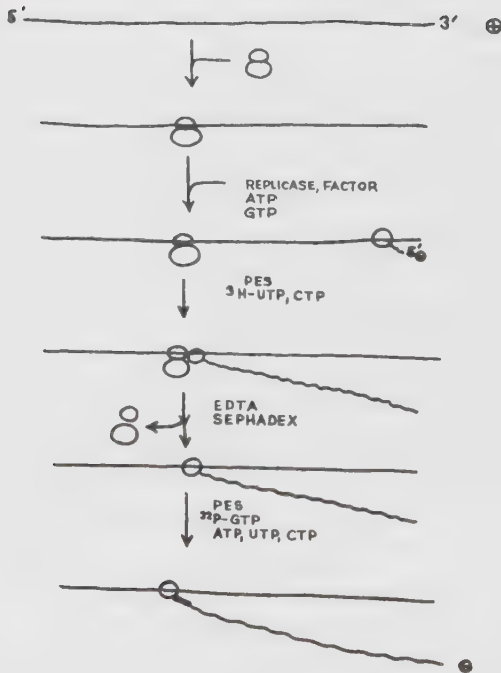


Fig. 5.2. Resynchronisation der Q β Replikase an Ribosomen-Bindungsstellen von Q β RNA

Das Verfahren erlaubt die selektive Markierung der Minusstrang-Sequenzen im Bereich der Ribosomen-Bindungsstellen, sowie die Messung der Distanz dieser Stellen vom 3'-Ende. Das markierte Segment ist dick ausgezogen. Weitere Erläuterungen im Text. Aus Kolakofsky & al. (1973).

wo das Enzym mit dem gebundenen Ribosom kollidierte. Durch Zugabe von EDTA konnte das Ribosom selektiv von der RNA abgelöst werden. Der Komplex von Replikase, Matrice und Minusstrang-Produkt blieb unter diesen Bedingungen weitgehend stabil und wurde durch Gelfiltration von Substraten und EDTA befreit. Zugabe von Nukleosid-Triphosphaten (radioaktiv markiert mit hoher spezifischer Aktivität) sowie von Magnesiumionen erlaubte dem Komplex eine synchrone Wiederaufnahme der Synthese. Diese wurde nach kurzer Inkubationszeit zum Stehen gebracht, so dass jeder (nichtradioaktiv) angefangene Minusstrang um ein kurzes, markiertes Segment verlängert wurde, und zwar genau an der Stelle, wo das Ribosom auf der Plus-Strang-Matrice durch seine Bindung das Fortschreiten der Synthese verhindert hatte. Durch Sucrosegradienten-Zentrifugation wurde das Produkt in zwei recht homogene Peaks aufgelöst: Eine Hauptkomponente mit einer Kettenlänge von etwa 3000 Nukleotiden und eine Nebenkomponekte mit einer solchen von etwa 2000 Nukleotiden. Die Sequenzbestimmung an den radioaktiven Segmenten der beiden Produkte ergab beim längeren Produkt die zur Ribosomenbindungsstelle des Hüllprotein-Cistrons komplementäre Sequenz, beim kürzeren die Komplementärsequenz zur Ribosomenbindungsstelle des Replikase-Cistrons.

Auf Grund dieses Resultats beträgt die Distanz vom Hüllprotein-Cistron-Anfang bis zum 3'-Ende ca. 3000 Nukleotide, diejenige vom Anfang des Replikase-Cistrons zum gleichen Ende etwa 2000 Nukleotide. Während das Molekulargewicht des Replikase-Genprodukts recht genau mit der dafür zur Verfügung stehenden RNA-Länge (ca. 2000 N.) übereinstimmt, beträgt die zwischen den Anfängen des Hüllprotein- und des Replikase-Cistrons liegende Distanz (1000 N.) mehr als das Doppelte dessen, was für das Cistron des Hüllproteins mit seinen 131 Aminosäuren benötigt würde. Die Funktion dieser vermeintlichen Lücke zwischen den beiden Cistrons klärte sich, als nachgewiesen wurde (Weiner & Weber, 1971; Moore & al., 1971), dass ein viertes phagenspezifisches Protein, das A1-Protein (MW 38000) in seinem N-terminalen Teil die gleiche Sequenz wie das Hüllprotein aufweist. A1-Protein entsteht dann dadurch, dass gelegentlich ein Ribosom das Terminations-Signal des Hüllprotein-Cistrons "übersieht"

und in den zwischen dem Ende des Hüllprotein-Cistrons und dem Anfang des Replikase-Cistrons liegenden Bereich hineinliest ("read-through"). Das Terminations-Signal des Hüllprotein-Cistrons besteht nur aus einem einfachen UGA-Triplett (Weiner & Weber, 1973); diese Art von Terminatoren ist bekannterweise "undicht" (leaky) und wird bei normalen *E. coli* mit einer Frequenz von ca. 3 % als Tryptophan-Codon "missverstanden". Tatsächlich wurde nachgewiesen, dass im A1-Protein ein Tryptophanrest am Ende der Hüllproteinsequenz auftritt und in die weiter C-terminal liegenden Sequenzen überleitet. Im Einklang mit diesen Befunden steht auch die Beobachtung, dass in UGA-Suppressorstämmen der Anteil an A1-Protein in der Phagenhülle erhöht ist (Weiner & Weber, 1971); umgekehrt ist dieser Anteil in Streptomycin-resistenten Stämmen, in welchen allgemein die Suppression erschwert ist (Chan & al., 1971), reduziert.

Ueber den Terminationspunkt für das A1-Protein-Cistron war schon seit längerem bekannt, dass er sich vor dem Anfang des Replikase-Cistrons befinden muss, denn auf Grund der in dieser Region bestimmten RNA-Sequenzen (Steitz, 1972; Porter & al., 1974) gibt es mehrere Terminations-Signale, und zwar in allen drei Rastern, auf der 5'-Seite dieses Cistron-Anfangs. In Fig. 5.5. (Abschnitt 5.2.2.3.) ist eine in dieser Region vorkommende UAGUAA Sequenz als mutmasslicher Terminator bezeichnet; für diese Wahl spricht insbesondere der Umstand, dass den zwei Terminations-Tripletts ein Alanin- und ein Arginin-Codon vorausgehen, denn es wurde gefunden (H. Weber, unveröff.), dass bei der tryptischen Verdauung von A1-Protein ein Alanin-Rest abgespalten wird. Demnach befindet sich zwischen dem A1- und dem Replikase-Cistron eine intercistronische Region von 21 Nukleotiden (inkl. zwei Terminations-Codons).

Die Ergebnisse neuerer Sequenzbestimmungs-Arbeiten (M. Billeter & Mitarb., persönliche Mitteilung) bestätigten diese Terminations-Stelle, indem sich der dadurch definierte Leseraster durch die Abwesenheit von Unsinn-Codons im vor dem Terminations-Signal befindlichen Bereich auszeichnete.

In gleicher Weise konnten kürzlich auch die Terminations-Stellen der verbleibenden zwei Cistrons festgelegt werden (M. Billeter & Mitarb., persönliche Mitteilung). Demgemäss ist das Terminations-Signal des A2-Protein-Cistrons ein UGA-Triplett, das sich 21-23 Nukleotide vor dem Initiator-AUG des Hüllprotein-Cistrons befindet (vgl. Fig. 4.8., Abschnitt 4.5.3.2.3.). Das Ende des Replikase-Cistrons bildet ein UAA-Triplett, 101-99 Nukleotide vom 3'-Ende der Q β RNA.

Fig. 5.3. zeigt eine Neufassung der Genkarte des Bakteriophagen Q β (vgl. Fig. 2.2.), unter Berücksichtigung der bisher diskutierten (und einiger noch zu diskutierender) Befunde. Zum Vergleich ist auch die Genkarte des Phagen MS2 als Vertreter der Gruppe I im gleichen Massstab dargestellt, wobei die Ähnlichkeit der Anordnung Maturationsprotein-Hüllprotein-Replikase mit zugehörigen extra- und intercistronischen Sequenzen ins Auge sticht. Ein auffälliger Unterschied zwischen den beiden Genomen besteht in der Abwesenheit eines A1 ("read-through") Protein-Cistrons bei MS2. Laut neusten Berichten (persönliche Mitteilungen von J. Steitz, T. Blumenthal und N. Zinder) besitzt aber auch das MS2-Genom eine Art vierten Cistrons: Es handelt sich um das Gen für ein Lyse-Protein (75 Aminosäuren), welches unweit vom Ende des Hüllprotein-Cistrons in einem zweiten Raster beginnt und sich über die "intercistronische Region" hinweg in den Anfang des Replikase-Cistrons hinein erstreckt.

Zur Funktion der übrigen extra- und intercistronischen Regionen müssen wir uns vorläufig mit wenigen Anhaltspunkten begnügen. Die den Cistrons unmittelbar vorgelagerten Sequenzen spielen eine wichtige Rolle bei der Initiation der Proteinsynthese (siehe Abschnitt 5.2.2.1.). Die terminalen RNA-Sequenzen sind unzweifelhaft bei der Initiation der RNA-Synthese sowohl des Plus- wie des Minus-Strangs von grosser Bedeutung (siehe Kap. 4.). Als weitere, mehr hypothetische Funktionen dieser Regionen könnten z.B. die Resistenz gegen zelluläre RNase oder eine Rolle bei der Verpackung der RNA in die Proteinhülle in Frage kommen. Dieser Problemkreis wird unter Anwendung der gezielten in vitro-Mutationstechnik untersucht,

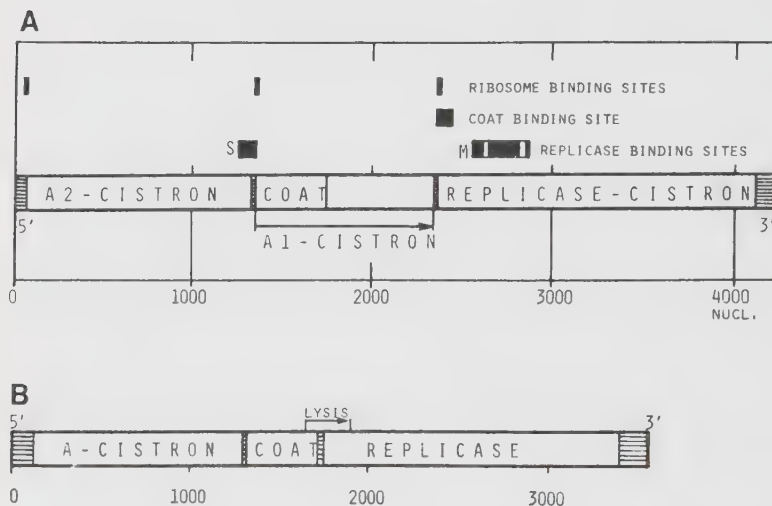


Fig. 5.3. Genkarten der RNA-Phagen Q β und MS2

A. Die Genkarte von Q β . Es handelt sich um eine Wiederholung der Darstellung von Fig. 2.2., wobei zusätzlich auch die Bindungsstellen für Ribosomen, Hüllprotein (siehe Abschnitt 5.2.2.3.) und Replikase eingezeichnet sind.

B. Die Genkarte von MS2 (Fiers & al., 1976).

wobei es bereits gelang, im 3'-terminalen Bereich sowohl letale (Flavell & al., 1975) wie auch nicht-letale (Domingo & al., 1976; Nagata & al., 1979) Punktmutationen zu charakterisieren.

5.2. Die zeitliche und quantitative Steuerung der Proteinsynthese

5.2.1. Der Verlauf der Proteinsynthese in vivo

Die zur Produktion von Phagenpartikeln in der Zelle notwendigen phagenspezifischen Makromoleküle werden in ganz verschiedener Menge und teilweise auch zu verschiedenen Zeitpunkten im Infektionszyklus benötigt.

Schon im Kapitel 2 haben wir festgestellt, dass pro Phagenhülle 180 Untereinheiten Hüllprotein, jedoch nur ein Molekül Maturationsprotein (A2) sowie einige wenige Moleküle A1 Protein gebraucht werden. Es lässt sich auch leicht einsehen, dass es vom "Phagen-Standpunkt" aus am rationellsten ist, möglichst schnell viel Phagen-RNA herzustellen, denn die neusynthetisierte Plusstrang-RNA kann dann in grossen Mengen als mRNA für die Synthese der Phagen-Proteine eingesetzt werden. Replikase sollte deshalb möglichst schnell nach der Infektion in genügender Menge zur Verfügung stehen.

Experimentell hing die Untersuchung der phagenspezifischen Proteinsynthese in vivo davon ab, dass die Synthese der zellulären Proteine, die ja bei RNA-Phagen nicht (wie z.B. bei T-Phagen) durch spezifische Mechanismen abgestellt wird, durch künstliche Massnahmen unterdrückt werden konnte. Dies geschah am einfachsten, indem die Transkription durch Behandlung der infizierten Bakterien mit Actinomycin D oder Rifampicin gehemmt wurde. Die angebotenen radioaktiven Aminosäuren wurden so fast ausschliesslich in phagenspezifische Proteine eingebaut. Nach verschiedenen Zeitintervallen wurden dann solche Zellen künstlich lysiert und die Produkte der radioaktiven Proteinsynthese durch SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese qualitativ und quantitativ bestimmt.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen (Viñuela & al., 1968; Nathans & al., 1969) liessen vermuten, dass die Synthese der Phagen-Komponenten einer differenzierten Steuerung unterliegt, welche eine rationelle Phagenproduktion gewährleistet. In Fig. 5.4. sind Resultate von solchen Versuchen an MS2-infizierten *E. coli* dargestellt. Aufgetragen sind hier diejenigen Mengen an radioaktivem Leucin, welche zu verschiedenen Zeiten nach Infektion jeweils während eines kurzen Zeitabschnitts in die drei Phagenproteine eingebaut wurden, d.h. es handelt sich nicht um die Gesamtmenge der akkumulierten Proteine, sondern um ihre Synthesegeschwindigkeiten. Aus der Darstellung geht klar hervor, dass die drei Proteine in sehr unterschiedlichem Ausmass produziert werden, wobei wie erwartet Hüllprotein bei weitem die höchste Syntheserate aufweist; ihr maximaler Wert beträgt etwa das Fünffache desjenigen vom Maturationsprotein und mehr als das Zehnfache desjenigen von Replikase. Zeitlich betrachtet erreicht Replikase ihre maximale Rate am frühesten, nämlich schon ca. 15 min. nach Infektion, die weitere Synthese dieses Proteins geht dann abrupt zurück. Das Maximum der Maturationsprotein-Synthese ist nach etwa 25 min. erreicht und nimmt dann ebenfalls ab, wenn auch etwas langsamer als Replikase. Die Hüllprotein-Produktion kommt auf ihren maximalen Wert erst ca. 40 min. nach Infektion, d.h. zu einem Zeitpunkt, da bereits freie Phagen freigesetzt werden. Diese Ergebnisse stehen inscharfem Kontrast zu Befunden bei tierischen RNA-Viren, z.B. Poliovirus, wo alle Virusproteine gleichzeitig und in aequimolarer Menge synthetisiert werden.

Weitere Resultate wurden mit Hilfe dieser Arbeitstechnik durch Verwendung von mutanten Phagenstämmen erzielt (Lodish & Zinder, 1966; Viñuela & al., 1968; Nathans & al., 1969). Nach Infektion von *E. coli* durch MS2- oder f2-Phagen mit Unsinn-Mutationen im Replikase-Gen konnte überhaupt keine phagenspezifische Proteinsynthese nachgewiesen werden, unter anderem ein Hinweis dafür, dass der grösste Teil dieser Proteinsynthese im Wildtyp offenbar unter Verwendung von neu synthetisierter RNA als Messenger zustande kommt. Unsinn-Mutationen im Maturationsprotein bewirken wie erwartet das Fehlen der Maturationsprotein-Bande in der

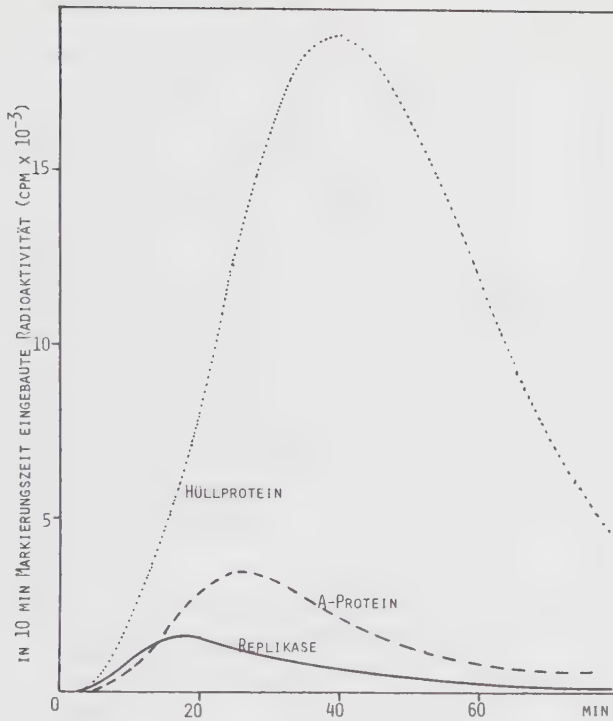


Fig. 5.4. Syntheseraten der phagenspezifischen Proteine nach Infektion mit MS2

Actinomycin-behandelte E.coli Sphaeroplasten wurden zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion während jeweils 10 min mit [³H] Leucin markiert. Die Menge der in die verschiedenen Proteine (aufgetrennt durch Gel-Elektrophorese) eingebauten Radioaktivität ist gegen den Zeitpunkt nach Infektion (Mitte der Markierungsperiode) aufgetragen. Daten umgezeichnet nach Viñuela & al. (1968), wo auch die experimentellen Details zu finden sind.

Polyacrylamid-Gelen, hatten aber keinen Einfluss auf die Synthese der beiden anderen Proteine.

Die interessantesten Ergebnisse erhielt man mit Hüllprotein-Mutanten, von denen 2 Klassen unterschieden werden konnten. Bei der ersten Klasse handelt es sich um Unsinn-Mutationen, welche ganz am Anfang des Hüllprotein-Cistrons lokalisiert sind (ein besonders genau untersuchter Stamm trägt an Stelle des siebten Aminosäure-Codons ein Unsinn-Codon). Solche Mutationen haben einen stark polaren Charakter, insofern als sie nicht nur die Synthese vom Hüllprotein, sondern auch von Replikase total unterdrücken. Infolgedessen unterscheiden sich diese Mutanten in ihrer Proteinsynthese-Aktivität nicht von Replikase-Mutanten, d.h. sie zeigen überhaupt keine nachweisbare Synthese von Phagen-Proteinen. Die zweite Klasse von Hüllprotein-Mutanten besteht aus Mutationen, die weiter weg vom Anfang des Hüllprotein-Cistrons lokalisiert sind. Diese Stämme zeigen keine Polarität, sondern im Gegenteil die Eigenschaft, ungewöhnlich hohe Mengen von Replikase zu produzieren; die Menge Maturationsprotein ist in der Größenordnung des Wildtyps.

Genau besehen handelt es sich bei dieser Replikase-Ueberproduktion weniger um eine Erhöhung der maximalen Synthese-Rate als um die Tatsache, dass diese, im Gegensatz zum Wildtyp, über längere Zeit beibehalten wird.

Die Eigenschaften der zwei Klassen von Hüllprotein-Mutanten weisen darauf hin, dass bestimmte Vorgänge bei der Synthese von Hüllprotein für die Regulation der Replikase-Synthese eine wichtige Rolle spielen, und zwar sowohl beim Einschalten wie beim Ausschalten derselben. Im grossen und ganzen ähnliche Verhältnisse wurden für den Phagen Q β nachgewiesen (Horiuchi & Matsushashi, 1970; Ball & Kaesberg, 1973). Ein gewisser Unterschied scheint in der Form des Polaritätsgradienten im Hüllprotein vorzuliegen, der sich bei Q β relativ flach durch das ganze Cistron hinzieht, im Gegensatz zu der diskontinuierlichen Stufe kurz nach Anfang des Cistrons bei den Phagen der Gruppe I.

5.2.2. Die molekularen Regulationsmechanismen bei der phagen-spezifischen Proteinsynthese

5.2.2.1. Die Affinität der Ribosomen für bestimmte RNA-Sequenzen

Wie bereits mehrfach erwähnt, findet man Ribosomen in Initiationskomplexen mit intakter Phagen-RNA praktisch ausschliesslich an die Initiationsstelle des Hüllproteins gebunden. Dies ist also die Stelle auf der Phagen-RNA, für welche die Ribosomen bei weitem die grösste Affinität zeigen. Gemäss Untersuchungen an R17 RNA (Steitz, 1973) verändern sich die Verhältnisse drastisch, wenn anstelle von intakter Phagen-RNA ein Gemisch von kurzen RNA-Fragmenten verwendet wird, welche die drei ribosomalen Bindungsstellen tragen. In dieser Versuchsanordnung muss das Ribosom auf Grund der lokalen Primärstruktur, d.h. der Nukleotidsequenz, auswählen, und es zeigt sich, dass die Mehrzahl der Ribosomen nun den Anfang des Maturationscistrons bevorzugen, gefolgt vom Anfang des Replikase-Cistrons; der Anfang des Hüllprotein-Cistrons wird nur in verschwindend kleinen Mengen gebunden.

Diese Reihenfolge der Affinitäten ist möglicherweise erklärbar im Lichte der weiter oben erwähnten Hypothese von Shine und Dalgarno (1974), wonach eine pyrimidinreiche Sequenz am 3'-Ende der ribosomalen 16S-RNA bei der Ribosomenbindung eine Rolle spielt, indem sie mit kurz vor dem Initiator-Codon liegenden, purinreichen Sequenzen der mRNA basenpaart.

Wie aus Fig. 5.1. hervorgeht, erstreckt sich diese Komplementarität beim Anfang des R17-Hüllprotein-Cistrons nur über 5 Nukleotide, beim Anfang des Replikase-Cistrons ist die komplementäre Region dagegen 6 und beim Maturationsprotein-Cistrons 7 Nukleotide lang. Im Falle der Maturationsprotein-Initiationsstelle ist die Wechselwirkung so stabil, dass es gelang, die Basenpaarung mit dem 3'-Ende der 16S-RNA anhand der Bindung des 3'-terminalen Colicin-E3 Fragmentes direkt nachzuweisen (J.A. Steitz & K. Jakes, 1975).

Weitere Untersuchungen (J.A. Steitz & al., 1977) zeigten jedoch, dass die Affinität der Ribosomen für die Basen-Sequenzen an den Initiationsstellen nicht allein durch die Stabilität der erwähnten RNA - RNA-Interaktion bestimmt ist. Das ribosomale Protein S-I sowie die Initiationsfaktoren IF_2 und IF_3 spielen bei der Selektion ebenfalls eine Rolle, und zwar stimulieren sie gemeinsam die Bindung am Hüllprotein-Cistron und (weniger) am Replikase-Cistron. In Gegenwart dieser Proteine ist daher die Ribosomenbindung an den 3 Cistrons relativ ausgeglichen, mit einer mässigen Bevorzugung des Hüllprotein-Cistrons, während die beiden anderen Cistrons nicht wesentlich voneinander verschiedene Affinitäten aufweisen.

Es besteht kein Grund anzunehmen, dass die Verhältnisse bei Q β wesentlich verschieden sind. Die Shine-Dalgarno Wechselwirkung am Maturationsprotein-Cistron umfasst ebenfalls 7, diejenige am Replikase-Cistron 6 Nukleotide. Beim Hüllprotein-Cistron sind jedoch nur 4 Basenpaare (wovon 1 G-U Paar) möglich, so dass hier in noch vermehrtem Masse andere Faktoren für die Bevorzugung des Hüllprotein-Cistrons verantwortlich gemacht werden müssen.

5.2.2.2. RNA - RNA-Wechselwirkungen als Steuer-Elemente der Protein-Synthese

Die Tatsache, dass die relativen Affinitäten für die drei Cistron-Anfänge verschieden ausfallen, je nachdem ob intakte oder fragmentierte Phagen-RNA für die Bindung verwendet wird, deutet offensichtlich darauf hin, dass die Sekundär- und Tertiärstruktur der intakten RNA für die Steuerung der Ribosomen eine wichtige Funktion ausübt. Bei Verwendung intakter Phagen-RNA binden Ribosomen in vitro weder am Anfang des Maturationsprotein-Cistrons noch des Replikase-Cistrons. Da das Maturationsprotein-Cistron auf der 5'-Seite der intakten RNA liegt, gibt es in vivo eine ganz bestimmte Periode, in welcher der Anfang dieses Cistrons als kurzes Fragment vorliegt: in statu nascendi. Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass Ribosomen in vitro an Maturationsprotein-

Initiationsstellen binden, wenn diese in naszierenden Plus-Strang-Fragmenten vorliegen (Robertson & Lodish, 1970; Staples & al., 1971). Es scheint naheliegend, dass auch in der Zelle die Zeitspanne und das Ausmass der Maturationsprotein-Synthese anhand der Verfügbarkeit von naszierenden Plussträngen reguliert wird.

Die Zugänglichkeit des Replikase-Cistrons wird offenbar über einen anderen Mechanismus reguliert. Aufgrund der im Abschnitt 5.2.1. erwähnten Befunde mit polaren Hüllprotein-Mutanten schlug Lodish (1968) vor, dass die Replikase-Cistron-Initiationsstelle in intakter Phagen-RNA normalerweise durch Basenpaarung mit einem Segment nahe beim Beginn des Hüllprotein-Cistrons blockiert ist. Mit dem Durchgang von Hüllprotein produzierenden Ribosomen an dieser Stelle würde diese RNA - RNA-Interaktion aufgebrochen, und die Initiationsstelle des Replikase-Cistrons würde für Ribosomen zugänglich. Bei der Sequenzbestimmung an MS2 RNA wurde eine solche "long range" Basenpaarungs-Interaktion, aufgrund der Sequenz-Komplementarität, zwischen diesen beiden RNA-Regionen postuliert (Min Jou & al., 1972). Dass beim Phagen Q β der Polaritäts-Gradient einen flacheren Verlauf zeigt, kann durch die Annahme erklärt werden, dass beim Durchlaufen des Hüllprotein-Cistrons durch Ribosomen eine ganze Reihe von RNA-Konformationsänderungen erfolgen, welche die Replikase-Cistron-Initiationsstelle immer besser zugänglich machen. Der wichtigste Punkt im Zusammenhang mit der Proteinsynthese-Regulation ist hier, dass durch diese Anordnung die Hüllprotein-Initiation eine übergeordnete Steuerfunktion erhält, sozusagen die Funktion eines Hauptschalters, durch welchen die Synthese sowohl von Hüllprotein wie von Replikase kontrolliert werden kann. Da wie erwähnt Maturationsprotein an intakter RNA wahrscheinlich gar nicht initiiert werden kann, handelt es sich hier um einen Mechanismus, der die gesamte Proteinsynthese an intakter Q β RNA von einem Punkt aus zu kontrollieren erlaubt.

5.2.2.3. Phagenproteine als Translations-Repressoren

Die Existenz der unpolaren Hüllprotein-Mutanten, welche durch eine späte Ueberproduktion von Replikase charakterisiert sind, deutet auf eine direkte Funktion des Hüllproteins im Wildtyp bei der Regulation der Replikase-Synthese. Die Vermutung wurde bestätigt durch Resultate der in vitro-Synthese von Phagenproteinen, welche zeigten, dass zugesetztes Hüllprotein spezifisch auf die Synthese von Replikase hemmend wirkt, d.h. als Translationsrepressor funktioniert (Sugiyama & Nakada, 1967). Phagen-Hüllprotein bindet die homologe RNA in spezifischer Weise: Sowohl bei R17 (Bernardi & Spahr, 1972) wie auch bei Q β (Weber, 1976) konnte gezeigt werden, dass sich die Bindungsstelle in der intercistronischen Region vor dem Replikase-Cistron befindet und mit der Initiationsstelle dieses Cistrons überlappt. Fig. 5.5.A zeigt die Ausdehnung und die Sequenz von hüllproteingebundenen RNA-Fragmenten, welche nach mildem T₁-RNase-Abbau von Q β Hüllprotein-RNA Komplexen isoliert werden konnten. Die gebundenen Sequenzen zeigen die Fähigkeit zur Bildung stabiler Sekundärstruktur-Schleifen (Fig. 5.5.B). Im Fall von R17 wurde nachgewiesen, dass die Bindung von Hüllprotein die Denaturierungsgeschwindigkeit eines solchen helikalen Elements wesentlich herabsetzt, was so interpretiert werden muss, dass dieses helikale Element an der Protein-RNA-Wechselwirkung direkt beteiligt ist (Gralla & al., 1974). Schliesslich ergab sich aus einer ganzen Reihe von Resultaten, dass auch Replikase die Funktion eines Translations-Repressors ausübt. Zugabe einer äquivalenten Menge von Replikase blockiert die Bindung von Ribosomen an Q β RNA praktisch vollständig, die Ribosomenbindung an R17 RNA wird dagegen nur wenig beeinträchtigt (Kolakofsky & Weissmann, 1971A).

In einem aktiven Q β Proteine synthetisierenden in vitro-System lässt sich nach Zusatz von Replikase mit Hilfe der Sedimentations-Analyse beobachten, wie die Polysomen mangels Neu-Initiation langsam zerfallen und schliesslich ganz verschwinden (Kolakofsky & Weissmann, 1971B).

Offensichtlich beschränkt sich die Hemmung durch Replikase auf den Bindungs- bzw. Initiationsschnitt der Proteinsynthese, einmal angefangene Peptidketten können ungehemmt fertigsynthetisiert werden.

Wie schon in einem früheren Kapitel (Abschnitt 4.4.3.2.3.) erwähnt, ergab sich eine molekulare Grundlage für diesen Hemmungseffekt in dem Befund, dass Replikase mit der RNA-Region am Anfang des Hüllprotein-Cistrons eine starke Bindung eingeht (S-Stelle, Weber & al., 1972). Während also Hüllprotein durch Bindung der Replikase-Cistron-Initiatorstelle die Synthese von Replikase unterdrückt, hemmt Replikase durch Bindung der Hüllprotein-Initiationsstelle die Hüllproteinsynthese. Infolge der obenerwähnten Kopplung der Replikase-Synthese an die Hüllprotein-Synthese bewirkt nun aber die Bindung von Replikase einen Block für jegliche Neuinitiation von Proteinsynthese auf der intakten Q β RNA.

Der mögliche Nutzen eines solchen Blockierungsmechanismus wird ersichtlich, wenn man sich vergegenwärtigt, dass ein und dasselbe RNA Molekül sowohl für Ribosomen als auch für Replikase als Matrize dienen muss. Bei der Proteinsynthese bewegt sich das Ribosom auf der mRNA in der 5'→3'-Richtung, im Gegensatz dazu bewegt sich Replikase bei der RNA-Synthese in 3'→5'-Richtung auf der Matrize. Da die beiden Prozesse in der Zelle gleichzeitig vor sich gehen, scheinen ständige Kollisionen zwischen Ribosomen und Replikasemolekülen unvermeidlich, sofern nicht ein Mechanismus existiert, der einen "Einbahnverkehr" erzwingt. Wie schon früher erwähnt (Abschnitt 5.1.2.), ist Replikase nicht fähig, ein auf Q β RNA gebundenes Ribosom zu verdrängen; eine Kollision zwischen Replikase und Ribosom wäre deshalb höchstwahrscheinlich ein letales Ereignis. Gemäss dem von Kolakofsky & Weissmann (1971A) vorgeschlagenen Modell ist es die Replikase selbst, die durch ihre Aktivität als Translationsrepressor den "Verkehrspolizisten" auf der Q β RNA spielt. Durch ihre Bindung am Anfang des Hüllprotein-Cistrons verhindert sie jede weitere Bindung von Ribosomen und sorgt so dafür, dass sich die RNA langsam von Ribosomen entleert. Nach Abgang des letzten Ribosoms kann dann die Initiation der RNA-Synthese erfolgen.

Fig. 5.5. Nukleotidsequenz der von Q β Hüllprotein gebundenen Q β RNA-Region

A. Drei von Hüllprotein gebundene Fragmente von 88, 71 und 27 Nukleotiden Länge wurden durch Polyacrylamidgel-Elektrophorese isoliert. Bestimmung ihrer Nukleotidsequenz zeigte, dass alle Fragmente den schon früher sequenzierten (Porter & al., 1974) Anfang des Replikase-Cistrons enthielten. Experimentelle Details siehe Weber, 1976.

B. Mögliche Sekundärstruktur in der Region der Q β Hüllprotein-Bindungsstelle. Die Darstellung zeigt zusätzliche 35 Nukleotide von der 5'-Seite des Fragments C-1, welche das Ende des A1-Cistrons enthalten (M. Billeter, persönliche Mitteilung). Gemäss Tinoco & al. (1973) betragen die freien Energien (ΔG) für die Bildung der Terminator-Schleife -4.8 kcal, der Initiator-Schleife -6.6 kcal und der grossen Schleife -23.6 kcal.

5.2.2.4. Ein Terminationssignal als Regulator der Proteinsynthese

Wie schon im Abschnitt 5.1.2. ausgeführt, wird die relative Menge der Synthese von A1 Protein ("readthrough"-Protein) und Hüllprotein durch die "Durchlässigkeit" des Terminations-Signals des Hüllproteins bestimmt. Obwohl diese Durchlässigkeit von Bakterienstamm zu Bakterienstamm erheblich schwanken kann, besteht kein Grund anzunehmen, dass sie auch während des Infektionszyklus nennenswerten Veränderungen unterworfen ist. Es ist deshalb anzunehmen, dass die A1 Protein-Synthese zeitlich der Hüllproteinsynthese parallel läuft, wobei die (molare) Menge des synthetisierten A1 Proteins stets etwa 3 % der Hüllproteinmenge beträgt.

5.2.3. Zusammenfassende Darstellung der regulierten Synthese-Abläufe

Nachdem die verschiedenen Steuerungsmechanismen einzeln aufgezählt worden sind, soll im folgenden versucht werden, die Regulation des quantitativen und zeitlichen Ablaufs der phagenspezifischen makromolekularen Synthese im (teilweise hypothetischen) Zusammenhang darzustellen. Zur Veranschaulichung zeigt Fig. 5.6. einzelne Stadien des Ablaufs in schematischer Darstellung.

- A. Sofort nach seinem Eindringen in die E. coli Zelle wird das Q β RNA-Molekül von einem Ribosom gebunden. Da die Initiationsstellen des Replikase- und des Maturationsprotein-Cistrons durch RNA-Sekundärstruktur verschlossen sind, erfolgt die Bindung des Ribosoms ausschliesslich an der Hüllprotein-Initiationsstelle.
- B. Nachdem die ersten Ribosomen über den proximalen Teil des Hüllprotein-Cistrons gewandert sind, hat sich die Sekundärstruktur-Blockierung des Replikase-Cistrons gelöst; Ribosomen können nun auch am Replikase-Cistron initiieren. Etwa 3 von hundert Ribosomen "verpassen" das Hüllprotein-Terminations-Signal und synthetisieren A1-Protein.

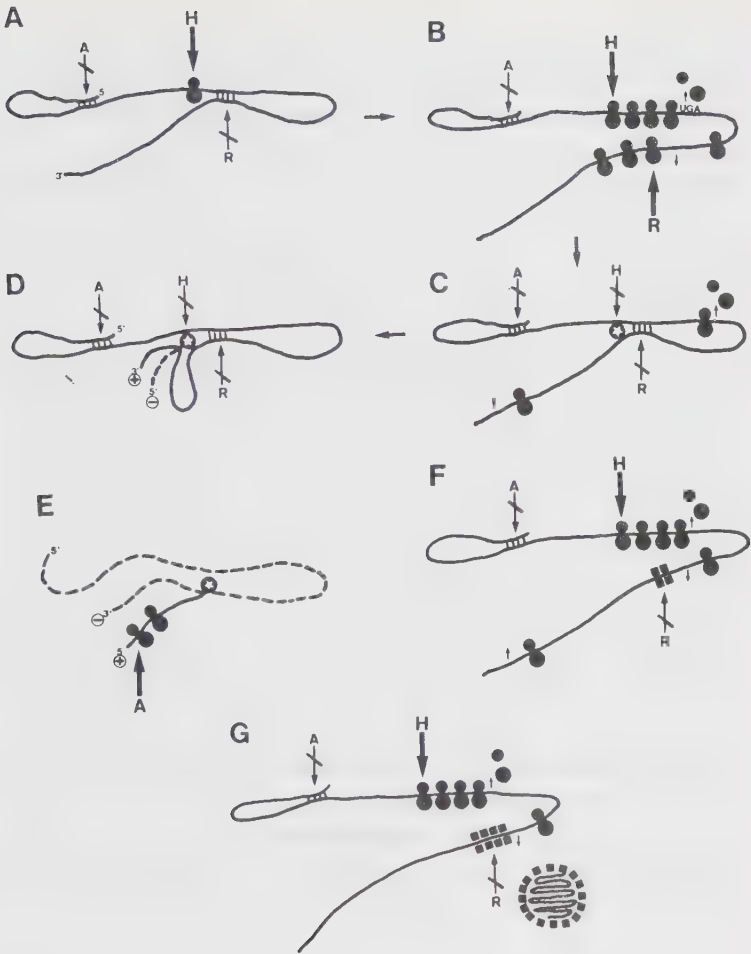


Fig. 5.6. Schematische Darstellung der phagenspezifischen makromolekularen Synthese und ihrer Regulation

Erläuterungen im Text. Symbole: A, H, R: Initiationsstellen für A2-Protein, Hüllprotein bzw. Replikase (β -Untereinheit). Fette Pfeile: Offene Initiationsstellen. Dünne, durchgestrichene Pfeile: Geschlossene Initiationsstellen. Kleine Pfeile: Termination. $\bullet$ Ribosomen, $\oplus$ Replikase, $\blacksquare$ Hüllprotein, — Q β Plusstrang, ---- Q β Minusstrang.

(In teilweiser Anlehnung an Weissmann, 1974).

- C. Eine fertiggestellte Replikase- β -Untereinheit hat ihre drei zell-eigenen Untereinheiten rekrutiert und blockiert nun die Bindung neuer Ribosomen am Anfang des Hüllprotein-Cistrons. Infolgedessen schliesst sich auch das Replikase-Cistron wieder. Ribosomen, die schon eine Peptidkette angefangen haben, synthetisieren diese fertig und verlassen dann die RNA.
- D. Replikase bindet nun mit Hilfe von Wirtsfaktor auch das 3'-Ende der Q β RNA und beginnt mit der Synthese von Minusstrang RNA.
- E. Die Minusstrang RNA wird als Matrize zur Synthese von neuen Plussträngen verwendet. An den naszierenden, kurzen Plusstrang-Ketten binden Ribosomen, welche die Maturationsprotein-Synthese initiieren.
- F. Akkumuliertes Hüllprotein bindet am Anfang des Replikase-Cistrons und stellt so die Replikase-Synthese allmählich ab. Dies ist unter anderem auch deshalb wichtig, weil verhindert werden muss, dass ein zu grosser Teil der RNA wegen des Replikase-Blocks für die Proteinsynthese nicht genützt werden kann.
- G. Inaktivierungsprozesse an Replikase und Minusstrang RNA bringen die RNA-Synthese, und damit auch die Synthese von Maturationsprotein, immer mehr zum Erliegen. Es wird nur noch fast ausschliesslich und mit grosser Intensität Hüllprotein produziert. Das Hüllprotein aggregiert und bildet um immer mehr Plusstrang-RNA Moleküle Proteinschalen, in die auch A1 Protein und Maturationsprotein eingebaut werden. Infektiöse Phagen akkumulieren in der Zelle, die ihrer baldigen Lyse entgegengieht.

6. SCHLUSSBETRACHTUNGEN

Wenn man die zusammenfassende Darstellung des Infektionszyklus im letzten Abschnitt mit derjenigen vergleicht, welche zur Einführung am Anfang dieser Abhandlung (Kap. 3) gegeben wurde, so erhält man einen ungefähren Ueberblick über die Fortschritte, welche in etwas mehr als 10 Jahren im Verständnis der Replikation der RNA-Phagen erzielt worden

sind. Die eindrucklichsten dieser Fortschritte beziehen sich ohne Zweifel auf die Steuerungsmechanismen bei der makromolekularen Synthese der Phagenkomponenten. Die sehr beschränkte Menge an genetischem Material dieser Phagen enthält nicht nur die Information für den Aufbau der Phagenproteine, sondern determiniert darüber hinaus ein kompliziertes Netz von Regelmechanismen, das engstens an die biosynthetische Maschinerie der Wirtszelle angepasst ist und der Phagenreplikation eine hochgradig rationalisierte Organisation verleiht. Die Oekonomie dieser Organisation zeigt sich in einer Anzahl von Merkmalen, die teilweise seither auch in anderen Systemen aufgefunden wurden:

- Die Uebernahme multipler Funktionen durch die Phagenkomponenten. Die Phagen-RNA ist gleichzeitig genetisches Material, mRNA, Regulations-element bei der RNA- und Proteinsynthese, Bestandteil der Phagenstruktur und wahrscheinlich noch vieles andere. Sowohl Replikase wie Hüllprotein (vielleicht auch die A-Proteine?) haben Nebenfunktionen als Regulatoren der Proteinsynthese. Doppelfunktionen von Proteinen wurden z.B. auch bei RNA-Tumoviren nachgewiesen, wo ein bestimmtes Protein des Nucleocapsids (p15) als Protease wirkt, die an der Prozessierung des Vorläuferproteins beteiligt ist (von der Helm, 1977).
- Das Vorliegen von Doppelcistrons, d.h. von Segmenten genetischen Materials, deren Sequenz gleichzeitig für zwei verschiedene Proteine codiert, wie im Fall von Q β das "readthrough" System Hüllprotein/A1-Protein. Bei den Genomen mehrerer anderer Viren konnte kürzlich gezeigt werden, dass ein bestimmter Sequenzabschnitt gleichzeitig für zwei Proteine in verschiedenen Rastern codiert (ØX174: Sanger & al., 1977; MS2: siehe Abschnitt 5.1.2.; wahrscheinlich auch Polyoma/SV40: vgl. Smart & Ito, 1978).
- Die "Zweckentfremdung" von Wirtspoteinen als Untereinheiten für ein phagenspezifisches Enzym, die Q β -Replikase. Eine gewisse Analogie lässt sich z.B. ziehen zu dem Enzym Cytochrom-Oxidase, welches aus Untereinheiten besteht, die einen teils chromosomalen, teils mitochondrialen genetischen Ursprung aufweisen (Schatz & Mason, 1974).

Diese Beispiele sollen unter anderem zeigen, wie die am Q β Phagen gewonnenen Erkenntnisse nicht vereinzelte Kuriositäten verbleiben, sondern modellhaften Charakter für ein viel weiteres Gebiet annehmen können.

In einem noch weitergehenden Sinne trifft dies zu für die in dieser Abhandlung besonders ausführlich diskutierten Arbeiten über die Interaktionen zwischen Phagenproteinen und Phagen-RNA. Die Frage nach dem Mechanismus der spezifischen RNA-Protein Wechselwirkung ist eines der zentralen, immer noch ungelösten Probleme der Molekularbiologie, und die RNA-Phagen sind ohne Zweifel eines der geeignetsten Modellsysteme, die für Untersuchungen in dieser Richtung zur Verfügung stehen. Durch die hier präsentierten Resultate ist das Potential dieses Modellsystems keineswegs erschöpft. Insbesondere die kürzlich entwickelte Möglichkeit, die genetische Information des Q β Phagen in Form einer doppelsträngigen Komplementär-DNA in einem Hybrid-Plasmid zu vermehren und zur Expression zu bringen (Taniguchi & al., 1978), hat das Interesse an diesem Phagensystem erneut stark stimuliert. Als Folge dieser Entwicklung dürfte nicht nur die gesamte Nukleotidsequenz von Q β innert kürzester Zeit bekannt sein; auch für die Untersuchung von Struktur-Funktionsbeziehungen ergeben sich nun völlig neue Perspektiven. Es ist deshalb zu erwarten, dass die Arbeit an diesem System auch in Zukunft zu Resultaten führen wird, welche für das gesamte Gebiet der Molekularbiologie von Interesse sind.

REFERENZEN

- August, J.T., Banerjee, A.K., Eoyang, L., Franze de Fernandez, M.T., Hori, K., Kuo, C.H., Rensing, U. und Shapiro, L. (1968). Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 33, 73.
- Ball, L.A. und Kaesberg, P. (1973). J. Mol. Biol. 74, 547.
- Bandle, E. (1973) Dissertation Universität Zürich.
- Banerjee, A.K., Rensing, U. und August, J.T. (1969). J. Mol. Biol. 45, 181.
- Bernardi, A. und Spahr, P.F. (1972). Proc. Nat. Acad. Sci. USA 69, 3033.
- Billeter, M.A. (1978). J. Biol. Chem. 253, 8381.
- Billeter, M.A., Dahlberg, J.E., Goodman, H.M., Hindley, J. und Weissmann, C. (1969A). Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 34, 635.
- Billeter, M.A., Dahlberg, J.E., Goodman, H.M., Hindley, J. und Weissmann, C. (1969B). Nature 224, 1083.
- Blumenthal, T., Landers, T.A. und Weber, K. (1972). Proc. Nat. Acad. Sci. USA 69, 1313.
- Blumenthal, T., Young, R.A. und Brown, S. (1976). J. Biol. Chem. 251, 2740.
- Blumenthal, T. und Carmichael, G. (1979). Ann. Rev. Biochem. 48, 525.
- Brown, S. und Blumenthal, T. (1976). J. Biol. Chem. 251, 2749.
- Carmichael, G. (1975). J. Biol. Chem. 250, 3607.
- Carmichael, G.G., Landers, T.A. und Weber, K. (1976). J. Biol. Chem. 251, 2744.
- Caspar, D.L.D. und Klug, A. (1962). Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 27, 1.
- Chamberlin, M.J. (1974). Ann.Rev. Biochem. 43, 721.

- Chambon, P., Ramuz, M., Mandel, P. und Doty, J. (1967). *Biochim. Biophys. Acta* 149, 584.
- Chan, T.H.S., Webster, R.E. und Zinder, N.D. (1971). *J. Mol. Biol.* 56, 101.
- Domingo, E., Flavell, R.A. und Weissmann, C. (1976). *Gene* 1, 3.
- Ehresmann, C., Stiegler, P., Mackie, G.A., Zimmermann, R.A., Ebel, J.P. und Fellner, P. (1975). *Nucl. Acid Res.* 2, 265.
- Eikhom, T.S. und Spiegelman, S. (1967). *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 57, 1833.
- Eoyang, L. und August, J.T. (1968). *Methods in Enzymol.* 12B, 530.
- Escarmis, C., Sastry, P.A. und Billeter, M.A. (1978). *J. Biol. Chem.* 253, 8390.
- Feix, G., Pollet, R. und Weissmann, C. (1968). *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 59, 145.
- Feix, G. und Hake, H. (1975). *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 65, 503.
- Fiers, W., Contreras, R., Duerinck, F., Haegeman, G., Iserentant, D., Merregaert, J., Minjou, W., Molemans, F., Raeymaekers, A., Van den Berghe, A., Volkaert, G. und Ysebaert, M. (1976). *Nature* 260, 500.
- Flavell, R.A., Sabo, D.L., Bandle, E.F. und Weissmann, C. (1975). *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 72, 367.
- Franze de Fernandez, M.T., Eoyang, L. und August, J.T. (1968). *Nature* 219, 588.
- Gilbert, W. und Maxam, A. (1973). *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 70, 3581.
- Goetz, S. und Steitz, J.A. (1977). *J. Biol. Chem.* 252, 5177.
- Gralla, J., Steitz, J.A. und Crothers, D.M. (1974). *Nature* 248, 204.
- Groner, Y., Scheps, R., Kamen, R., Kolakofsky, D. und Revel, M. (1972). *Nature New Biol.* 239, 19.

- Guilley, H., Jonard, G. und Hirth, L. (1975). Proc. Nat. Acad. Sci. USA 72, 864.
- Haruna, I. und Spiegelman, S. (1965). Science 150, 884.
- Haruna, I., und Spiegelman, S. (1966). Proc. Nat. Acad. Sci. USA 55, 1256.
- Hindley, J. und Staples, D.H. (1969). Nature 224, 964.
- Hindley, J., Staples, D.H., Billeter, M.A. und Weissmann, C. (1970). Proc. Nat. Acad. Sci. USA 67, 1180.
- Hofstetter, H., Monstein, H.J. und Weissmann, C. (1974). Biochim. Biophys. Acta 374, 238.
- Hori, K., Eoyang, L., Banerjee, A.K. und August, J.T. (1967). Proc. Nat. Acad. Sci. USA 57, 1790.
- Hori, K., Harada, K. und Kuwano, M. (1974). J. Mol. Biol. 86, 699.
- Horiuchi, K. und Matsuhashi, S. (1970). Virology, 42, 49.
- Iglewski, W.J. (1976). Biochem. Biophys. Res. Commun. 68, 299.
- Kamen, R. (1969). Nature 221, 321.
- Kamen, R. (1970). Nature 228, 527.
- Kamen, R., Kondo, M., Römer, W. und Weissmann, C. (1972). Eur. J. Biochem. 31, 44.
- Kolakofsky, D. und Weissmann, C. (1971A). Nature New Biol. 231, 42.
- Kolakofsky, D. und Weissmann, C. (1971B). Biochim. Biophys. Acta 246, 596.
- Kolakofsky, D., Billeter, M.A., Weber, H. und Weissmann, C. (1973). J. Mol. Biol. 76, 271.
- Kondo, M., Gallerani, R. und Weissmann, C. (1970). Nature 228, 525.
- Kondo, M. und Weissmann, C. (1972A). Biochim. Biophys. Acta 259, 41.
- Kondo, M. und Weissmann, C. (1972B). Eur. J. Biochem. 24, 530.
- Konigsberg, W., Maita, T., Katze, J. und Weber, K. (1970). Nature 227, 271.

- Kornberg, A. (1969). Science 163, 1410.
- Kornberg, A. (1974). DNA-Synthesis, p. 103 (Freeman, S. Francisco).
- Kozak, M. und Nathans, D. (1971). Nature New Biol. 234, 209.
- Küppers, B. und Sumper, M. (1975). Proc. Nat. Acad. Sci. USA 72, 2640.
- Langridge, R., Billeter, M.A., Borst, P., Burdon, R.H. und Weissmann, C. (1964). Proc. Nat. Acad. Sci. USA 52, 114.
- Leppä, S.H., Bjoraker, B. und Bock, R. (1968). Methods in Enzymol. 12 B, 236.
- Levanon A., Mekler, P., Kappeler, M., Marti, D., Jaussi, R., Egg, A. und Billeter, M. (1979). Experientia 35, 957.
- Lodish, H.F. (1968). Nature 220, 345.
- Lodish, H.F., und Zinder, N.D. (1966). J. Mol. Biol. 19, 333.
- Loeb, T. und Zinder, N.D. (1961). Proc. Nat. Acad. Sci. USA 47, 282.
- Mekler, P. und Billeter, M.A. (1975). Experientia 31, 743.
- Meyer, F., Weber, H. und Weissmann, C. (1976). Experientia 32, 804.
- Meyer, F. und Weber, H. (1978). Abstracts IV Int. Congr. Virology, The Hague, p. 591.
- Meyer, F., Weber, H. und Weissmann C. (1981). J. Mol. Biol., in Vorbereitung.
- Meyer, F., Weber, H., Vollenweider, H.J. und Weissmann, C. (1975). Experientia 31, 743.
- Meyer, F. (1978). Diss. Universität Zürich.
- Mills, D.R., Peterson, R.L. und Spiegelman, S. (1967). Proc. Nat. Acad. Sci. USA 58, 217.
- Mills, D.R., Kramer, F.R. und Spiegelman, S. (1973). Science 180, 916.
- Mills, D.R., Kramer, F.R., Dobkin, C., Nishihara, T. und Spiegelman, S. (1975). Proc. Nat. Acad. Sci. USA 72, 4252.
- Mills, D.R., Nishihara, T., Dobkin, C., Kramer, F.R., Cole, P.E. und Spiegelman, S. (1977). In "Nucleic Acid-Protein Recognition" (H.J. Vogel, ed., New York, Academic Press) p.533.
- Min Jou, W., Haegeman, G., Ysebaert, M. und Fiers, W. (1972). Nature 237, 82.

- Moore, C.H., Farron, F., Bohnert, D. und Weissmann, C. (1971). *Nature New Biol.* 234, 204.
- Nagata, S., Bienz, B. und Weissmann, C. (1979). *Experientia* 35, 960.
- Overby, L.R., Barlow, G.H., Doi, R.H., Jacob, M. und Spiegelman, S. (1966). *J. Bact.* 91, 442.
- Nathans, D., Oeschger, M.P., Polmar, S.K. und Eggen, K. (1969). *J. Mol. Biol.* 39, 279.
- Palmenberg, A. und Kaesberg, P. (1974). *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 71, 1371.
- Peacock, A.C. und Dingman, C.W. (1968). *Biochemistry* 7, 668.
- Pirrota, V. (1975). *Nature* 254, 114.
- Pollet, R., Knolle, P. und Weissmann, C. (1967). *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 58, 766.
- Porter, A.G., Hindley, J. und Billeter, M.A. (1974). *Eur. J. Biochem.* 41 413.
- Pribnow, D. 1975. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 72, 784.
- Rensing, U. und August, J.T. (1969). *Nature* 224, 853.
- Robertson, H.D. und Lodish, H.F. (1970). *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 67, 710.
- Sanger, F., Brownlee, G.G. und Barrell, B.G. (1965). *J. Mol. Biol.* 13, 373.
- Sanger, F., Air, G.M., Barrell, B.G., Brown, N.L., Coulson, A.R., Fiddes, J.C., Hutchison III, C.A., Slocombe, P.M. und Smith, M. (1977). *Nature* 265, 687.
- Schaffner, W., Rüegg, K.J. und Weissmann, C. (1977). *J. Mol. Biol.* 117, 877.
- Schatz, G. und Mason, T.L. (1974). *Ann. Rev. Biochem.* 43, 51.
- Schwyzler, M. (1973). *Diss. Universität Zürich*.
- Senear, A.W. und Steitz, J.A. (1976). *J. Biol. Chem.* 251, 1902.
- Shine, J. und Dalgarno, L. (1974). *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 71, 1342.
- Silverman, P.M. (1973). *Arch. Biochem. Biophys.* 157, 222.
- Skogerson, L., Roufa, D. und Leder, P. (1971). *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 68, 276.

- Smart, J.E. und Ito, Y., (1978). *Cell* 15, 1427.
- Spiegelman, S., Haruna, I., Holland, I.B., Beaudreau, G. und Mills, D. (1965). *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 54, 919.
- Stanley, W.M. (1935). *Science* 81, 644.
- Staples, D.H. und Hindley, J. (1971). *Nature New Biol.* 234, 211.
- Staples, D.H. Hindley, J., Billeter, M.A., und Weissmann, C. (1971). *Nature New Biol.* 234, 202.
- Steinschneider, A. und Frankel-Conrat, H. (1966). *Biochemistry* 5, 2735.
- Steitz, J.A. (1969). *Nature* 224, 957.
- Steitz, J.A. (1972). *Nature New Biol.* 236, 71
- Steitz, J.A. (1973). *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 70, 2605.
- Steitz, J.A. und Jakes, K. (1975). *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 72, 4734.
- Steitz, J.A., Wahba, A.J., Laughrea, M. und Moore, P.M. (1977). *Nucleic Acid Res.* 4, 1.
- Stent, G. (1966). In "Phage and the Origins of Molecular Biology", p. 5 (Cold Spring Harbor).
- Sugiyama, T. und Nakada, D. (1967). *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 57, 1744.
- Taniguchi, T. und Weissmann, C. (1978). *J. Mol. Biol.* 118, 533.
- Taniguchi, T., Palmieri, M. und Weissmann, C. (1978). *Nature* 274, 223.
- Tinoco, I., jr., Borer, P.N., Dengler, B., Levine, M.D., Uhlenbeck, O.C., Crothers, D.M. und Gralla, J. (1973). *Nature New Biol.* 246, 40.
- Viñuela, E., Algranati, I.D., Feix, G., Garwes, D., Weissmann, C. und Ochoa, S. (1968). *Biochim. Biophys. Acta* 155, 558.
- Vollenweider, H.J., Sogo, J.M. und Koller, Th. (1975). *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 72, 83.
- Vollenweider, H.J., Koller, Th., Weber, H. und Weissmann, C. (1976). *J. Mol. Biol.* 101, 367.

- Von der Helm, K. (1977). Proc. Nat. Acad. Sci. USA 74, 911.
- Wahba, A.J., Miller, M.J. und Niveleau, A. (1974). J. Biol. Chem. 249, 3314.
- Weber, H. und Weissmann, C. (1970). J. Mol. Biol. 51, 215.
- Weber, H., Billeter, M.A., Kahane, S., Hindley, J., Porter, A. und Weissmann, C. (1972). Nature New Biol. 237, 166.
- Weber, H., Billeter, M.A. und Weissmann, C. (1973). In "Viral Replication and Cancer" (J.L. Melnick, S. Ochoa and J. Orð, eds.) Proceedings of the 2nd Duran-Reynals International Symposium, Barcelona.
- Weber, H., Kamen, R., Meyer, F. und Weissmann, C. (1974). Experientia 30, 711.
- Weber, H. (1976). Biochim. Biophys. Acta 418, 175.
- Weber, K. (1967). Biochemistry 6, 3144.
- Weiner, A.M., und Weber, K. (1971). Nature New Biol. 234, 206.
- Weiner, A.M. und Weber, K. (1973). J. Mol. Biol. 80, 837.
- Weissmann, C., Borst, P., Burdon, R.H., Billeter, M.A. und Ochoa, S. (1964). Proc. Nat. Acad. Sci. USA 51, 682.
- Weissmann, C. und Feix, G. (1966). Proc. Nat. Acad. Sci. USA 55, 1264.
- Weissmann, C., Feix, G. und Slor, H. (1968). Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 33, 83.
- Weissmann, C. (1974). FEBS Letters 40, S 10.
- Weissmann, C., Billeter, M.A., Goodman, H.M., Hindley, J. und Weber, H. (1973). Ann. Rev. Biochem. 42, 303.
- Zinder, N.D. (1975). "RNA Phages" (Cold Spring Harbor).

